



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

**INFLUÊNCIA DO SAL, pH E TEMPERATURA NO DESENVOLVIMENTO DE
ESTAFILOCOCOS COAGULASE NEGATIVA ISOLADOS DE PRODUTOS
CÁRNEOS FERMENTADOS**

EUNICE SOUSA GONÇALVES

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Fernando Manuel d'Almeida Bernardo

Doutor António Salvador Ferreira Henriques

Barreto

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

ORIENTADORA

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

2013

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

**INFLUÊNCIA DO SAL, pH E TEMPERATURA NO DESENVOLVIMENTO DE
ESTAFILOCOCOS COAGULASE NEGATIVA ISOLADOS DE PRODUTOS
CÁRNEOS FERMENTADOS**

EUNICE SOUSA GONÇALVES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Fernando Manuel d'Almeida Bernardo

Doutor António Salvador Ferreira Henriques

Barreto

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

ORIENTADORA

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

2013

LISBOA

FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CIÊNCIA

Este trabalho foi subsidiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia através do projeto “Portuguese traditional meat products: strategies to improve safety and quality” (PTDC/AGRALI/119075/2010).

DEDICATÓRIA

Ao meu querido pai, Saturnino Gonçalves, que sempre me incentivou e ensinou que “existem coisas difíceis, mas não impossíveis” À minha querida mãezinha, Ana Gonçalves e à Carolina Sousa pelo apoio incondicional.

À minha irmã Emília e ao meu bebezão Elvino.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Maria João Fraqueza, pela orientação, disponibilidade, amizade e sobretudo pelo apoio que me prestou ao longo deste estudo. Obrigada por tudo.

Ao Professor Rui Bessa pela ajuda e disponibilidade no tratamento dos dados estatísticos.

À Engenheira Maria José, à Maria Helena, Ana Rita, Andreia Chaves, Ana Martins e Cinthia Barroco pela disponibilidade, simpatia e ajuda nos momentos que mais precisei.

À minha família, pelo apoio, encorajamento, amor e ensinamentos que me conduzem em todas as etapas da minha vida e que me permitiram chegar até aqui. Espero que um dia percebam a minha ausência nas ocasiões especiais.

Aos meus amigos e colegas que me acompanharam ao longo do curso. Em especial à Susana Franco e Ana Ribeiro que sempre estiveram ao meu lado nos momentos difíceis.

À minha linda menina Ticha.

À todos que me apoiaram incondicionalmente, principalmente nos momentos de incerteza, tristeza desânimo e cansaço.

INFLUÊNCIA DO SAL, pH E TEMPERATURA NO DESENVOLVIMENTO DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE NEGATIVA ISOLADOS DE PRODUTOS CÁRNEOS FERMENTADOS

RESUMO

Os Estafilococos Coagulase Negativa (SCN) são bactérias isoladas a partir de uma ampla variedade de produtos cárneos fermentados. Os SCN possuem diversas propriedades tecnológicas importantes, das quais se destaca a capacidade de multiplicação em diferentes condições de temperatura, cloreto de sódio e pH. Mas também podem apresentar aspectos negativos, como a presença de resistências a antibióticos.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo selecionar estirpes sem qualquer resistência secundária a antibióticos e avaliar a capacidade desses selecionados para desenvolverem em temperaturas de 7 °C, 15 °C e 25 °C, na presença de 2 %, 4 % e 6 % de NaCl e a valores de pH 4,5, 5,5 e 6,5.

A partir dos resultados de antibioresistências, foram escolhidos 5 isolados de *Staphylococcus xylosus* (C1C3, L1M2, P1B2, S2M7 e S3M3) e 4 isolados de *Staphylococcus equorum* (Ch3C2, Cv1C2, P1B6 e SG3C5). Face às diferentes condições de estudo, dos resultados obtidos concluiu-se que as estirpes L1M2, S2M7, P1B2, Ch3C2 e Cv1C2, pelas suas capacidades de multiplicação e adaptação, são as mais indicadas para serem utilizadas em culturas de arranque.

Palavras-chave: Estafilococos Coagulase Negativa, produtos cárneos fermentados, cultura de arranque, temperatura, pH, NaCl

INFLUENCE OF SALT, pH AND TEMPERATURE ON THE DEVELOPMENT OF COAGULASE NEGATIVE STAPHYLOCOCCI ISOLATED FROM FERMENTED MEAT PRODUCTS

ABSTRACT

Coagulase negative staphylococci (SCN) are bacteria isolated from a wide range of fermented meat products. These bacteria have important technological properties, such as the ability to grow at different temperatures, in the presence of sodium chloride and between different pH. However the use of SCN also has negative aspects, such as these bacteria resistance to antibiotics.

Therefore, the purpose of this study was to select strains without secondary antibiotic resistance and assess their capacity to grow at temperatures of 7 °C, 15 °C and 25 °C, in the presence of 2 %, 4 % and 6 % of NaCl and at 4.5, 5.5 and 6.5 of pH.

According to the attained antibioresistance results, 5 strains of *Staphylococcus xylosus* (C1C3, L1M2, P1B2, S2M7 and S3M3) and 4 strains of *Staphylococcus equorum* (Ch3C2, Cv1C2, P1B6 and SG3C5) were selected. According to their ability to grow, under the different study conditions, strains L1M2, S2M7, P1B2, Ch3C2 and Cv1C2 would potentially be chosen to be used as starters.

Keywords: Coagulase negative staphylococci, fermented meat products, starter culture, temperature, pH, NaCl

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT	iii
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE A ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Produtos cárneos	3
2.1.1. Definição dos produtos cárneos fermentados	3
2.1.2. Classificação dos produtos cárneos fermentados	3
2.1.3. Processo de fabrico de enchidos fermentados.....	6
2.1.3.1. Matérias-primas	6
2.1.3.2. Condimentos e especiarias	7
2.1.3.3. Aditivos Alimentares.....	7
2.1.3.4. Invólucros	9
2.1.3.5. Fases de elaboração de enchidos fermentados	9
2.2. Caracterização dos Estafilococos Coagulase Negativa	11
2.2.1. Género <i>Staphylococcus</i>	11
2.2.1.1. <i>Staphylococcus xylosus</i>	12
2.2.1.2. <i>Staphylococcus carnosus</i>	13
2.2.1.3. <i>Staphylococcus equorum</i>	13
2.2.1.4. Outros.....	13
2.3. Culturas de arranque (<i>Starters</i>)	14
2.3.1. Propriedades tecnológicas das bactérias Estafilocólicas Coagulases Negativas usadas como <i>starters</i>	17
2.3.1.1. Atividade nitrato redutase.....	17
2.3.1.2. Atividade lipolítica e proteolítica	18
2.3.1.3. Atividade da catálase e superóxido dismutase.....	19
2.3.1.4. Capacidade de crescerem em diferentes condições de temperatura, pH e concentração de NaCl	20
2.3.2. A segurança alimentar e o uso das bactérias estafilocólicas como culturas <i>starters</i>	20
2.3.2.1. Formação de aminas biogénicas e nitrosamina	21
2.3.2.2. Envolvimento em processos infecciosos e produção de toxinas	22

2.3.2.3. Resistência a antibióticos.....	23
3. Influência do sal, pH e temperatura no desenvolvimento de estafilococcus coagulases negativo isolados dos produtos cárneos fermentados.....	25
3.1. Objetivos	25
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.2.1. Origem dos isolados em estudo.....	25
3.3. Caracterização genotípica	25
3.3.1. Preparação do material e cultura dos isolados em estudo	25
3.3.2. Extração do ácido desoxiribonucleico (DNA)	26
3.3.3. Método PCR <i>fingerprinting</i>	26
3.3.3.1. Electroforese dos produtos amplificados.....	27
3.4. Caracterização fenotípica	27
3.4.1. Testes de sensibilidade a antibióticos (TSA)	27
3.5. Critérios de seleção dos isolados para a determinação do efeito da temperatura, NaCl e pH	28
3.6. Determinação do efeito da Temperatura, NaCl e pH no crescimento dos <i>Staphylococcus</i>	29
3.7. Análise estatística.....	29
4. RESULTADOS	30
4.1. Caracterização genotípica das estirpes	30
4.1.1. PCR <i>fingerprinting</i>	30
4.2. Caracterização fenotípica das estirpes	33
4.2.1. Testes de sensibilidade a antibióticos.....	33
4.3. Estirpes selecionadas para o estudo do efeito da temperatura, NaCl e pH... 35	
4.3.1. Efeito da temperatura, NaCl e pH na multiplicação das estirpes de <i>Staphylococcus xylosus</i> e <i>Staphylococcus equorum</i> selecionadas.....	36
4.3.1.1. Efeito da temperatura a 7 °C.....	36
4.3.1.2. Efeito da temperatura a 15 °C.....	38
4.3.1.3. Efeito da temperatura a 25 °C.....	40
5. DISCUSSÃO	44
6. CONCLUSÃO.....	49
7. BIBLIOGRAFIA.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: PCR <i>fingerprinting</i> de alguns isolados de <i>Staphylococcus equorum</i> em estudo.....	30
Figura 2: Dendrograma da análise do perfil genético de estirpes <i>Staphylococcus equorum</i> s obtidos por PCR <i>Fingerprinting</i>	31
Figura 3: Dendrograma da análise do perfil genético de estirpes <i>Staphylococcus xylosus</i> obtidos por PCR <i>Fingerprinting</i>	32
Figura 4: Percentagem de sensibilidades e resistências aos 9 antibióticos (vancomicina (VA 30 µg), penicilina (P 10 UI), eritromicina (E 15 µg), tetraciclina (TE 30 µg), gentamicina (CN 10 µg) daltopristina/quinupristina (QD 15 µg) rifampicina (RD 5 µg), lincomicina (MY 15 µg) e cloranfenicol (C 30 µg)) apresentados pelas estirpes de <i>Staphylococcus equorum</i>	33
Figura 5: Percentagens de sensibilidades e resistências aos antibióticos (vancomicina (VA 30µg), penicilina (P 10UI), eritromicina (E 15µg), tetraciclina (TE 30µg), gentamicina (CN 10µg) daltopristina/quinupristina (QD 15µg) rifampicina (RD 5µg), lincomicina (MY 15µg) e cloranfenicol (C 30µg)) apresentados pelas estirpes de <i>Staphylococcus xylosu</i>	34
Figura 6: Variação da densidade óptica de cultura de estirpes de <i>Staphylococcus xylosus</i> à temperatura de 7 °C e pH 4,5 a 2 % (A) e 4 % (B) de NaCl.....	37
Figura 7: Variação da densidade óptica de culturas de estirpes de <i>Staphylococcus equorum</i> à temperatura de 7 °C e pH 5,5 a 2 % (C) de NaCl.....	37
Figura 8: Variação da densidade óptica de cultura de estirpes de <i>Staphylococcus xylosus</i> e <i>Staphylococcus equorum</i> à temperatura de 7 °C e pH 6,5 a 2 % (D) e 4 % (E) de NaCl.....	37
Figura 9: Variação da densidade óptica de culturas de estirpes de <i>Staphylococcus xylosus</i> à temperatura de 15 °C e pH 4,5 a 4 % (A) de NaCl	39
Figura 10: Variação da densidade óptica de culturas de estirpes de <i>Staphylococcus xylosus</i> e <i>Staphylococcus equorum</i> à temperatura de 15 °C e pH 5,5 a 2 % (B) de NaCl.....	39
Figura 11: Variação da densidade óptica de culturas de estirpes de <i>Staphylococcus xylosus</i> e <i>Staphylococcus equorum</i> à temperatura de 15 °C e pH 6,5 a 2 % (C) e 6 % (D) de NaCl.....	39
Figura 12: Variação da densidade óptica de culturas de estirpes de <i>Staphylococcus xylosus</i> e <i>Staphylococcus equorum</i> à temperatura de 25 °C e pH 4,5 a 2 % (A), 4 % (B) e 6 % (C) de NaCl	42

Figura 13: Variação da densidade óptica de culturas de estirpes de *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus equorum* à temperatura de 25 °C e pH 5,5 a 2 % (D), 4 % (E) e 6 % (F) e de NaCl.....42

Figura 13: (continuação) Variação da densidade óptica de culturas de estirpes de *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus equorum* à temperatura de 25 °C e pH 5,5 a 2 % (D), 4 % (E) e 6 % (F) de NaCl.....43

Figura 14: Variação da densidade óptica de culturas de estirpes de *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus equorum* à temperatura de 25 °C e pH 6,5 a 2 % (G), 4 % (H) e 6 % (I) de NaCl43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos produtos de salsicharia fermentados a nível microbiológico com base na a_w e no método de conservação4

Tabela 2: Dados históricos sobre o desenvolvimento das culturas de arranque15

Tabela 3: Espécies microbianas utilizadas como starters em produtos cárneos.....16

Tabela 4: Lista dos grupos de antibióticos em testes, respetivas concentrações *cut-off points* utilizados como critério de classificação da susceptibilidade.....28

Tabela 5: Relação entre a incidência de resistência aos antibióticos com a Unidade Fabril, dos isolados de SCN em estudo.....35

LISTA DE A ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC- *American Type Culture Collection*

a_w - Atividade de água

b.p- Pares de bases

BAL- Bactérias Ácido Láticas

CE- Comunidade Europeia

DL- Decreto-Lei

DNA- Ácido Desoxiribonucleico

DSMZ- *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*

DOP- Denominação de Origem Protegida

EDTA- *Ethylenediamine tetraacetic acid*

EFSA- *European Food Safety Authority*

ETG- Especialidade Tradicional Garantida

GRAS- *Generally Recognized as Safe*

IGP- Indicação Geográfica Protegida

$MgCl_2$ - Bicloreto de Magnésio

NaCl- Cloreto de sódio

$^{\circ}C$ - Graus Celsius

MSA- Manitol Salt Agar

OD- Densidade Ótica

PCR- *Polymerase chain reaction*

QPS- *Qualified Presumption of Safety*

rpm- Rotações por minuto

SAS- *Statistical Analysis System*

SCN- Estafilococos Coagulase Negativa

SCP- Estafilococcus Coagulase Positiva

SEs- Enterotoxinas

TBE- Tris-borato-EDTA

TSA- Testes de Sensibilidade à Antibióticos

UFC- Unidades Formadoras de Colónias

UI- Unidade Internacional

w/v- Peso/ volume

µg- Micrograma

µl- Microlitro

µm- Micrómetros

%- Percentagem

1. INTRODUÇÃO

Os produtos à base de carne constituem uma prática antiga de alimentos processados. As suas formulações datam de tempos passados persistindo até à atualidade. Os métodos de preparação variam consideravelmente, dando origem a uma grande variedade de produtos à base de carne. Dentro destes diferentes tipos de produtos destacam-se os produtos à base de carne fermentados.

Os produtos à base de carne fermentados são geralmente definidos como uma mistura de carne picada, aos quais são adicionados condimentos, especiarias e aditivos, que são introduzidas em invólucros naturais ou artificiais e submetidas a um processo de fermentação.

A fermentação destes produtos pode ocorrer de forma espontânea, promovida por microrganismos presentes na própria carne, ou pela adição de bactérias específicas vulgarmente denominadas por *starters*.

A adição dos *starters* nos produtos cárneos tem diferentes propósitos, nomeadamente diminuir o tempo de fermentação, aumentar o período de conservação do produto cárneo, bem como a sua qualidade e estabilidade microbiológica.

As culturas *starters* são compostas essencialmente por Bactérias Ácido Láticas (BAL) e Estafilococos Coagulase Negativa (SCN).

Os Estafilococos têm um papel fundamental no desenvolvimento da cor vermelha-rosada característica dos enchidos, através da atividade nitrato e nitrito redutase que segundo García-Varona, Santos, Jaime & Rovira (2000) e Leroy, Verluyten & De Vuyst (2006) é a propriedade tecnológica mais importante deste grupo de microrganismos. Os SCN são considerados como tendo maior ação e promoção sobre qualidade organolética, pelo desenvolvimento do aroma e do sabor específico, devido às capacidades lipolíticas e proteolíticas (Mauriello, Casaburi, Blaiotta & Villani, 2004). Também são capazes de prevenir a rancificação através da decomposição dos peróxidos (Barrière *et al.*, 2001).

Em termos de segurança alimentar, a utilização de SCN como culturas *starters* nos alimentos fermentados tem sido questionada, devido ao seu envolvimento em processos infecciosos, produção de enterotoxinas (Zell *et al.*, 2008), produção de aminas biogénicas (Vidal-Carou, Veciana-Nogués, Latorre-Moratalla & Bover-Cid, 2007) e ainda pela possibilidade de transportar genes de resistência a antibióticos (Cocconcelli, 2007), ambos de grande preocupação na saúde pública.

Pelas propriedades apontadas, o conhecimento dos SCN e da sua atividade é de grande importância na tecnologia dos produtos cárneos. Assim, este trabalho tem como objetivo: I) contribuir para a caracterização genotípica e fenotípica dos

estafilococos isolados em diversos produtos cárneos fermentados, em diferentes fases de produção e superfícies de diferentes ambientes fabris; II) selecionar estirpes com características de segurança apropriadas nomeadamente isenção de resistências a antibióticos para serem utilizadas como *starters* na produção de enchidos; III) avaliar a capacidade de alguns elementos selecionados, para crescerem em diferentes concentrações de cloreto de sódio, pH e temperatura.

A estrutura global da dissertação consta de: Revisão Bibliográfica, em que se faz uma pesquisa do estado da arte, descrevendo sobretudo as propriedades tecnológicas importantes e alguns aspetos de segurança relacionados com os Estafilococos Coagulases Negativa isolados nos produtos cárneos fermentados; Materiais e Métodos onde foram apresentados as metodologias aplicadas na caracterização genotípica, fenotípica e de determinação do efeito da temperatura, pH e NaCl no desenvolvimento destas estirpes; Apresentação dos Resultados obtidos aquando da aplicação das metodologias, sua Discussão e Conclusões face aos resultados apresentados neste e noutros estudos com indicação de estirpes SCN apropriadas para o uso como cultura *starter* em produtos cárneos fermentados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Produtos cárneos

2.1.1. Definição dos produtos cárneos fermentados

O Decreto-Lei nº 206 de 23 de Outubro de 2008 define os produtos à base de carne como sendo “produtos transformados resultantes da transformação da carne ou da ulterior transformação desses mesmos produtos, de tal modo que a superfície de corte à vista, permite verificar o desaparecimento das características da carne fresca”.

Os produtos à base de carne fermentados podem ser definidos como uma mistura de carne picada, gordura, sal, agentes de cura, açúcar, especiarias e outros aditivos, que são introduzidos em invólucros (tripas) naturais ou artificiais e submetidas a um processo de fermentação originada por microrganismos, associada a uma secagem ou fumagem, em que o produto final armazena-se normalmente sem refrigeração e consome-se cru (Schiffner, Oppel & Lörtzing, 1996).

Segundo Hammes, Bantleon, & Min (1990), os produtos à base de carne são produtos preparados a partir da matéria-prima fresca (carne), os quais adquirem propriedades e características específicas através de um processo no qual, os microrganismos estão envolvidos. Em certos casos, as enzimas endógenas da matéria-prima (carne) desempenham uma função decisiva na obtenção de tais produtos.

Antigamente a fermentação ocorria de forma espontânea e o papel dos microrganismos não era conhecido. No entanto, a forma de manusear e armazenar as matérias-primas em condições específicas contribuíam para o desenvolvimento de alimentos com características sensoriais apreciadas (Caplice & Fitzgerald, 1999).

2.1.2. Classificação dos produtos cárneos fermentados

Ao longo dos anos, os produtos à base de carne têm sido classificados de diversas maneiras, consoante o país ou a região onde são elaborados. As classificações podem ser baseadas em diferentes propriedades como: a atividade da água (a_w), o pH, a humidade, o conteúdo proteico, o rácio humidade/proteína e a perda de peso, originando produtos à base de carne fermentados com texturas e aromas característicos (Hansen, 2002; Talon *et al.*, 2008).

Lucke (2000) classifica os enchidos em secos e semi-secos, referindo que a ampla variedade desses produtos deve-se à composição da matéria-prima, ao tamanho dos fragmentos, aos tipos de invólucros usados e ao tempo de conservação.

O mesmo autor propõe uma classificação, dos produtos de salsicharia, de um ponto de vista microbiológico, com base na atividade da água (a_w) e no método de conservação (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação dos produtos de salsicharia fermentados do ponto de vista microbiológico com base na a_w e no método de conservação (Lucke, 2000).

Categoria	Tempo de maturação/Cura	Atividade da água (a_w)	Aplicação de fumagem
Enchidos secos com bolores	> 4 Semanas	<0,90	Não
Enchidos secos com bolores	> 4 Semanas	<0,90	Sim
Enchidos secos sem bolores	> 4 Semanas	<0,90	Sim/ Não
Enchidos semi-secos com bolores	<4 Semanas	0,90-0,95	Não
Enchidos semi-secos sem bolores	<4 Semanas (10-20 dias)	0,90-0,95	Sim
Produto de salsicharia fresco	<2 Semanas	0,94-0,96	Sim/Não

Munoz, Salas & Cornieles (1991) definem os enchidos secos como aqueles que perdem entre 25 a 40 % do seu peso inicial enquanto os semi-secos perdem cerca de 8 a 15 % de peso.

A Legislação no passado classificava os produtos a base de carne em: frescos, crus-marinados, crus-curados, tratados pelo calor, carnes salgadas, pratos de produtos cárneos preparados e outros derivados de carne.

Por sua vez, outros autores, reúnem os produtos de salsicharia fermentados em dois grandes grupos: os formados por peças de carne inteiras (com ou sem osso) e os formados por pastas (elaboradas com carne migadas), dentro dos quais estabelece outros subgrupos (Flores, 1977).

A classificação Francesa estabelece vários grupos diferenciados entre si pelas características das matérias-primas que constituem os produtos: formados por peças salgadas, por misturas de carne picada, produtos à base de carne e subprodutos comestíveis, e à base de sangue. Dentro destes grupos estabelecem-se diferentes categorias de acordo com o tratamento tecnológico aplicado (Flores, 1977).

Na Alemanha e nos países europeus de língua alemã, os enchidos dividem-se em três classes: crus; cozidos (tratados termicamente e elaborados principalmente com matérias-primas previamente cozidas) e escaldados (tratados pelo calor e elaborados geralmente com matérias-primas cruas) (Fornias & Diaz, 1990).

O continente europeu é o maior produtor e consumidor de enchidos fermentados, existindo uma grande variedade no mercado devido às diferentes tradições culturais entre os países e regiões, bem como ao recurso a diferentes matérias-primas, ingredientes, formulações, processos de fabrico, condições de fermentação e culturas de arranque adicionadas ou não (Talon, Leroy & Lebert, 2007; Garriga & Aymerich, 2007). A fermentação desses produtos pode ser realizada a temperatura de 18 a 24 °C entre 1 a 2 dias ou a temperatura baixa durante uma semana (Mauriello *et al.*, 2004). Em Portugal e noutros países do Mediterrâneo os produtos de salsicharia têm um pH final de 5,3 a 6,2 enquanto no Norte da Europa o pH é inferior a 5 (Talon *et al.*, 2007).

Os produtos tradicionais portugueses são únicos, tendo origem na zona geográfica que lhes dá o nome e têm uma forte ligação ao desenvolvimento dessa região. A qualidade do produto é influenciada pelas raças de animais, solo, vegetação, clima e pela tecnologia de fabrico, isto é, diferentes raças de suínos, com alimento diversificado, originam diferenças de paladar nos enchidos (Silva, 2003 citado por Guerreiro, 2011).

Com o objetivo de valorizar e proteger os produtos tradicionais, surgiu a necessidade de adotar estratégias, o que se tem conseguido através da criação das Denominações de Origem Protegida (DOP), das Indicações Geográficas Protegidas (IGP) e das Especialidades Tradicionais Garantida (ETG). Assim a União Europeia atribuiu, através do Regulamento (CE) nº 510/2006 do Conselho, de 20 de Março de 2006, relativo à protecção das indicações geográficas e denominações de origem dos produtos agrícolas e dos géneros alimentícios e do Regulamento (CE) nº 509/2006 do Conselho, de 20 de Março de 2006, relativo às especialidades tradicionais garantidas dos produtos agrícolas e dos géneros alimentícios, uma protecção especial aos produtores de “especialidades regionais”.

No Alentejo existem dois produtos de salsicharia com “Denominação de origem”: o “Presunto de Barrancos” e a carne de “Porco alentejana”. E ainda produtos com “Indicação geográfica”: “Lombo Branco de Portalegre”, “Lombo Enguitado de Portalegre”, “Painho de Portalegre”, “Cacholeira Branca de Portalegre”, “Chouriço Mouro de Portalegre”, “Linguiça de Portalegre”, “Morcela de Assar de Portalegre”, “Morcela de Cozer de Portalegre”, “Farinheira de Portalegre”, “Chouriço de Portalegre”, “Chouriço de carne de Estremoz e Borba”, “Chouriço Grosso de Estremoz e Borba”, “Farinheira de Estremoz e Borba”, “Paia de Lombo de Estremoz e Borba”, “Paia de Toucinho de Estremoz e Borba”, “Paio de Estremoz e Borba”, “Paio de Beja” e “Linguiça ou Chourico de Carne do Baixo Alentejo” (Barreto, 2012; Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e Pescas, 2001).

2.1.3. Processo de fabrico de enchidos fermentados

Nos últimos anos o processo de fabrico passou a ser maioritariamente industrial, embora persistam ainda pequenas unidades de fabrico tradicional, com produtos muito valorizados pelo consumidor (Talon & Leroy, 2006). No processo de elaboração tradicional, foram introduzidas a mecanização com a utilização de câmaras de secagem e /ou fumagem com controlo de temperatura e humidade relativa, tornando possível a maturação e produção de enchidos ao longo de todo o ano e em qualquer zona geográfica independentemente das condições climáticas (Neves, 2011).

O processo de fabrico que define os enchidos fermentados compreende a redução da carne fresca e da gordura em fragmentos e sua mistura com os condimentos, especiarias e aditivos, seguida do enchimento, período de fermentação e do processo de secagem e/ou fumagem.

2.1.3.1. Matérias-primas

Na elaboração de enchidos podem ser utilizadas carnes de ungulados domésticos e aves, sendo a escolha da carne dependente das tradições, da disponibilidade e do tipo de produto, das considerações religiosas e do mercado a que se destina (Lucke, 2000). Contudo os produtos de salsicharia portugueses são quase exclusivamente feitos à base de carne de porco.

As carnes utilizadas na produção de enchidos devem ser firmes, com elevado poder tampão e com boa capacidade de retenção de água. O valor de pH desta deve estar entre 5,6 e 6,0 (Pezacki, 1979 citado por Elias, Fraqueza & Barreto, 2006).

A gordura a ser usada na elaboração de enchidos deve ser firme, na grande maioria localizada na região dorsal (toucinho), com baixo teor em ácidos gordos insaturados, uma vez que esta aumenta a ocorrência de fenómenos de oxidação lipídica e de exsudação da gordura do enchido (Frey, 1995, citado por Elias *et al.*, 2006).

A quantidade de gordura afeta a qualidade do produto, na medida em que é responsável pela textura, suculência e sabor. Quando se utilizam peças muito ricas em gordura, pode-se obter produtos com uma percentagem de matéria gorda que ultrapassará os limites aceitáveis, com inconvenientes tecnológicos como: baixo poder de retenção de água, difícil ligação da massa e mau aspeto. Por outro lado, uma percentagem muito baixa de gordura levará a uma excessiva dissecação do produto que ficará seco e quebradiço, afetando a aparência, textura e sabor (Abreu *et al.*, 1962, citado por Elias, 2004).

Consoante o tipo de enchidos outras matérias-primas não cárneas podem ser utilizadas tais como o sangue, fígado, rins, coração e pulmões.

A água é uma matéria-prima aplicada com o objetivo de dissolver e difundir os ingredientes e aditivos, permitindo uma melhor homogeneização da massa (Ruiz, 2007).

2.1.3.2. Condimentos e especiarias

Os condimentos e especiarias são ingredientes que desempenham funções muito importantes, não só a nível organolético, mas também na transformação e conservação do produto final. Estes ingredientes quando adicionados constituem uma das características que distingue os enchidos entre si. O sal, o alho ou massa de alho, a massa de pimentão ou colorau, são muito utilizados na elaboração de produtos de salsicharia.

O sal, para além de realçar o sabor, diminui a atividade da água, inibe o crescimento microbiano, facilita a solubilidade das proteínas e reduz a atividade de algumas enzimas evitando a ocorrência de processos oxidativos (Ruiz, 2007).

O alho está presente nos produtos de salsicharia fermentados e secos numa proporção de 1 a 3% (Vignolo, Fontana & Fadda, 2010). O pimentão pode ser utilizado para transmitir coloração alaranjada aos enchidos (Elias, Santos & Raposo, 2007).

Dependente do tipo de enchido, região e costume de cada fabricante, vários outros ingredientes podem ser empregues, como: vinagre ou vinho, cebola, salsa, louro, cravinho, cominhos, noz-moscada, tomilho, canela, orégão, mostarda, arroz, pão, erva-doce, entre outros. Alguns deles são aplicados em quantidades muito pequenas devido à forte ação aromática e saborizante.

2.1.3.3. Aditivos Alimentares

São inúmeros os aditivos utilizados na indústria de carnes, desempenhando funções no âmbito da conservação, transformação, melhoria das qualidades organoléticas e aumento de rendimento. Porém, em doses elevadas, os aditivos alimentares podem ser tóxicos causando efeitos nefastos ao consumidor. Por este motivo, para cada aditivo existe uma dose diária admissível (Fraqueza, 2012).

Fernández (2000) refere oito grupos de aditivos usados na elaboração de enchidos: i) os corantes (cochinilha, carotenóides, xantófilas), ii) os conservantes (o ácido sórbico e os seus sais de sódio e de potássio, os agentes sulfitantes, os nitratos e os nitritos de sódio e de potássio, podendo ser utilizados também para estabilização da cor), iii) os antioxidantes (naturais como os tocoferóis, ou artificiais como o ácido ascórbico e os ascorbatos), iv) os estabilizantes, emulsionantes, espessantes e gelificantes (fosfatos, carragenatos, caseinatos, proteínas de soja), v) os potenciadores do sabor (ácido glutâmico e glutamatos, ácido guanílico e guanilatos), vi) os reguladores do pH

(ácido láctico, ácido cítrico, glucona- δ -lactona), vii) os reguladores da maturação (por exemplo glucose, sacarose, lactose, culturas de arranque); e, viii) por último, alguns aditivos para tratamento de superfície.

O nitrito tem um papel muito importante na indústria transformadora de carne, a nível da formação da cor vermelha característica dos produtos, na formação de nitrosamioglobina, como agente antimicrobiano, como antioxidante, interferindo ainda no desenvolvimento do sabor e aromas típicos dos produtos (Hammes, 2012).

De acordo com as especificações da Legislação Portuguesa, a quantidade legalmente autorizada para o fabrico de produtos cárneos não tratados termicamente é de 150 mg/kg de nitrito de potássio ou nitrito de sódio adicionado e de 300 mg/kg de nitrato de potássio adicionado (Decreto-Lei 33/2008).

Como agente conservante, para alguns autores é garantida a segurança do alimento com o recurso a doses entre 80 a 100 mg/kg de nitrito, outros propõem valores não inferiores a 150 mg/kg, ou valores nunca inferiores a 250 mg/kg de nitrito (Fonseca, 1991; Schuddeboom, 1993 & Hubbert *et al.*, 1996 citado por Salavessa 2009).

Os açúcares são adicionados em quase todos os produtos cárneos em pequenas quantidades, com o objetivo de melhorar o sabor e pela sua capacidade de reagir com proteínas, dando lugar às reações de Maillard (Barreto, 2012). Nos enchidos fermentados, os açúcares são uma fonte de energia para as bactérias ácidas lácticas, que produzem ácido láctico mais rapidamente na sua presença (Ruiz, 2007).

A glucose, dextrose, sacarose e lactose podem ser incorporadas nos produtos de salsicharia. Nos enchidos de fermentação rápida, considera-se suficiente o uso de 0,5-0,7% de glucose ou sacarose ou 1% de lactose, enquanto, para os produtos de salsicharia de fermentação lenta admite-se, em regra, níveis de 0,3% para a glucose ou sacarose, ou ainda 0,5% de lactose (Ruiz, 2007).

Os fosfatos são utilizados nos produtos cárneos para desenvolver a capacidade de retenção de água e por vezes aumentar o rendimento do produto. Permitem uma maior ligação da carne à gordura, facilitando o processo de secagem, consequentemente uma maior suculência e um aumento da vida útil dos enchidos (Roncalés, 2007).

Os sulfitos utilizados nos produtos de salsicharia atuam como agentes conservantes, na medida em que inibe o desenvolvimento de *Pseudomonas* sp., *Brochothrix thermosphacta*, *Enterococcus* sp., Enterobacteriaceae, *Lactobacilos* e leveduras oxidativas, impedindo ainda, de uma forma mais pronunciado, o desenvolvimento de *Salmonela* e *Escherichia coli* (Ough, 1993 citado por Salavessa 2009). Também agem como antioxidante inibindo as reacções de escurecimento enzimático e não enzimático (reações de Maillard) do alimento.

O ácido ascórbico e os seus sais são utilizados como auxiliares no processo de formação e fixação da cor dos produtos cárneos curados, funcionando como um agente redutor (reage com o nitrito reduzindo-o a óxido nítrico) e antioxidante (Roncalés, 2007; Honikel, 2008).

No sentido de obter maior padronização no aspeto dos enchidos fermentados, outros aditivos podem ser usados, recorrendo-se muitas vezes a corantes e proteínas não cárneas. As proteínas não cárneas são substâncias de composição e funcionalidade semelhante à proteína da carne, por exemplo: as proteínas do leite (caseína e lactoalbuminas), as proteínas animais (plasma e gelatinas) e as proteínas vegetais (soja, trigo e ervilha) (Barreto, 2012).

O ácido láctico e o ácido cítrico são reguladores de pH, que podem ser adicionados às formulações tradicionais, onde não contêm culturas de arranque, por forma a promover uma rápida descida do pH no início da fase de maturação (Rust, 2007).

2.1.3.4. Invólucros

Na produção de enchidos são utilizados invólucros, geralmente tripas naturais e artificiais. As tripas naturais utilizadas nos processos artesanais são provenientes dos intestinos delgado e grosso de vários animais. Estas devem estar em boas condições higiénicas e íntegras, de forma a suportar as pressões exercidas durante o enchimento (Elias, 2004). Outros invólucros naturais também muito empregues são o estômago, a bexiga, o reto e as serosas peritoneais. Entretanto a utilização desses produtos varia entre países e entre os diferentes tipos de enchidos (Wu & Chi, 2007).

Muitos fatores influenciam a qualidade das tripas, tais como a saúde do animal, espécie, idade e raça, bem como o tipo de alimentação, o processo de abate e a porção do trato intestinal que se pretende usar (Wu & Chi, 2007).

Todos os tipos de tripas devem proporcionar à massa de carne maturada coesão, forma e dimensão bem como proteção de influências externas, entre elas, contaminações bacterianas, não podendo estas constituir uma fonte de contaminação microbiana, física ou química (Elias *et al.*, 2006).

2.1.3.5. Fases de elaboração de enchidos fermentados

A tecnologia de produção dos enchidos engloba várias fases. Numa primeira fase, as matérias-primas são cortadas em pequenos fragmentos, adicionados e misturados os ingredientes adequados a cada tipo de enchido.

Passando em seguida para um período de repouso, no qual se realiza o fenómeno de maturação. A maturação de enchidos fermentados engloba reações físicas, químicas e microbiológicas. Durante esta fase ocorre mudanças significativas que podem ser resumidas da seguinte forma: i) decréscimo do pH, ii) desenvolvimento da população

microbiana, iii) redução do nitrato em nitritos e este último para o óxido nítrico, iv) formação de nitrosomioglobina, v) solubilização e gelificação de proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas, vi) fenómenos proteolíticos, lipolíticos e oxidativos e vii) desidratação (Casaburi *et al.*, 2007).

Posteriormente, realiza-se o enchimento da massa maturada em tripas apropriadas, que pode ser feito manual ou mecanicamente com auxílio de uma enchedora. O enchimento deve ser realizado de forma que a massa entre sob pressão e preencha toda a tripa, evitando espaços com ar e permitindo ao mesmo tempo a dilatação máxima da tripa, compatível com a sua elasticidade (Wu & Chi, 2007).

Segundo Ordonez e De la Hoz (2007), a quantidade de ar que entra na tripa, influencia a estabilidade da cor e do aroma, provoca alterações na fermentação, e desenvolvimento de bactérias patogénicas.

Após o enchimento os produtos de salsicharia são submetidos a um processo de cura, que dá continuidade às reações físicas, químicas e microbiológicas iniciadas na fase de maturação conduzindo à obtenção de um produto com características organoléticas e de conservação diferentes das matérias-primas que lhes deu origem (Casaburi *et al.*, 2007).

Na indústria de salsicharia portuguesa são geralmente utilizadas os seguintes processos de estabilização dos enchidos: o escaldão, a fumagem e ou secagem (Elias, 2004).

A fumagem consiste na colocação dos enchidos em câmaras, estufas, fumeiros ou lareira de modo a ficarem expostos ao fumo resultante da combustão de madeiras duras como o azinho, a faia, o sobro, entre outros.

Este processo modifica o aroma, o sabor, a textura e a cor dos produtos, aumenta a capacidade de conservação, exerce uma ação antioxidante sobre as gorduras, além da sua ação bacteriostática, a qual permite estabilizar a carga microbiana do produto final (Andrés, Barat, Grau & Fito, 2007).

Após a fumagem, os enchidos continuam a sofrer secagem, o que pode ser conseguido através de um ambiente controlado em camaras de estabilização, à temperatura ambiente ou no próprio fumeiro. Nesta fase ocorre redução da atividade da água para valores que permitem a conservação e a segurança sanitária dos produtos, e um conjunto de fenómenos bioquímicos que determinam as características organoléticas (sápidas e aromáticas), que são características da salsicharia tradicional (Patarata, Cardoso, Bessa, Silva & Martins, 1998).

Em Portugal, França, Itália e Espanha, os enchidos fermentados e secos apresentam valores de a_w compreendidos entre 0,83 e 0,93 e um período de secagem que varia entre 4 a 12 semanas, enquanto nos enchidos da Grécia a a_w geralmente é de 0,95

devido ao período de secagem curto compreendido entre 1 a 3 semanas (Lebert, Leroy & Talon, 2007).

Durante a secagem os produtos cárneos transformados perdem, por evaporação da água, cerca de 30 a 49% do seu peso inicial (Andrés *et al.*, 2007).

Uma ventilação excessiva provoca uma desidratação rápida com consequente endurecimento precoce do enchido (Toldrá & Leroy 2006). Se pelo contrário a ventilação for fraca, a desidratação é lenta e nota-se uma flacidez dos enchidos (Carvalho, 2010).

A duração do período de secagem é variável, dependendo da temperatura, da humidade, da velocidade e das características do fluxo de ar, bem como, do tamanho dos fragmentos das matérias-primas (carne e gordura) e dos invólucros usados na formulação dos enchidos (Andrés *et al.*, 2007).

2.2. Caracterização dos Estafilococos Coagulase Negativa

2.2.1. Género *Staphylococcus*

Os Estafilococos Coagulase Negativa pertencem à classe Bacilli, inseridas na família *Staphylococcaceae* englobando quatro géneros, que são os *Staphylococcus*, os *Jeotigalicoccus*, os *Macrococcus* e os *Salinicoccus* (De Vos *et al.*, 2009).

As bactérias do género *Staphylococcus* foram isoladas pela primeira vez por Robert Kock em 1878, descritas e cultivadas por Pasteur em 1880. Em 1882, um cirurgião escocês Alexander Ogston, adaptou o nome da palavra grega “*staphylo*” que significa cacho de uva.

O género *Staphylococcus* reúne bactérias de forma esféricas, Gram-positivos com 0.5 a 1.5 µm de diâmetro, imóveis, isolados, dispostas aos pares ou em cachos, não esporulados, aeróbios ou anaeróbios facultativos. Têm metabolismo respiratório e/ou fermentativo, são redutores de nitratos, oxidase negativa e catalase positiva. Utilizam hidratos de carbono ou aminoácidos como fonte de energia (De Vos *et al.*, 2009).

Crescem na presença de 10% de cloreto de sódio e a temperatura compreendida entre 18 e 40°C (De Vos *et al.*, 2009).

As suas colónias são geralmente opacas, podendo ser de cor branca, amarelada, creme ou laranja (Carvalho, 2010).

A parede celular das bactérias deste género contém peptidoglicanos e ácido teicoico na sua constituição. A composição da parede celular e o teor de Guanina (G) e Citosina (C) permite caraterizar e distinguir o género *Staphylococcus*, já que possuem baixo teor de G+C (< 50mol%) (De Vos *et al.*, 2009).

Os *Staphylococcus* são geralmente encontrados na pele e nas mucosas do Homem e animais de sangue quente, mas também numa ampla variedade de produtos

alimentares como a carne, o queijo e o leite, e de fontes ambientais como o solo, a areia, o ar e a água (Kloos & Schleifer, 1975; Bonomo Ricciardi, Zotta, Sico, & Saltzano, 2009; De Vos *et al.*, 2009).

A capacidade de produzir coagulase por sua vez divide os estafilococos em dois grupos: os Estafilococos Coagulase Positiva (SCP) e os Estafilococos Coagulase Negativa (SCN). Este último inclui as espécies de *S.xylosus*, *S.carnosus*, *S.equorum*, *S.simulans*, *S.saprophyticus*, *S.epidermidis*, *S.haemolyticus*, *S.warneri*, *S.lentus* entre outras.

Atualmente estão descritas 48 espécies e 26 subespécie pertencentes ao género *Staphylococcus* (Euzéby, 2013).

2.2.1.1. *Staphylococcus xylosus*

Staphylococcus xylosus são cocos de 0.8 a 1.2 µm de diâmetro, que formam colónias com 5 a 10 mm de diâmetro com coloração variável, desde laranja-amarelado a amarelo-acinzentado. Estes microrganismos apresentam um excelente crescimento em meios de cultura com concentração de NaCl de 10 % e a uma temperatura de 15 °C, mas muitas delas não evidenciam crescimento a 45 °C (Kloos & Schleifer, 1975).

Alguns *Staphylococcus xylosus* produzem ácidos a partir de vários hidratos de carbono, como a glucose, a manose, a xylose, a frutose, a manitol, a maltose, a sucrose, a lactose, a galactose, a arabinose ou a trealose. Outros não usam a celobiose, a lactose, a arabinose ou o manitol para a produção de ácido (García-varona, Santos, Jaime & Rovira, 2000).

A capacidade do *S. xylosus* para fermentar a glucose leva a produção de pequenas quantidades de L-Lactato. Certas estirpes produzem elevadas quantidades de manitol intracelular, comparativamente a outras estirpes estafilocócicas (Kloos & Schleiffer, 1986). García-Varona *et al.*, (2000) citam que *S. xylosus* é a espécie de *Staphylococcus* frequentemente isolada nos produtos cárneos fermentados.

As atividades metabólicas desejáveis desenvolvidas dos *S. xylosus* nos produtos fermentados são a produção de catalase, nitrato redutase e a redução do oxigénio da superfície do produto, contribuindo assim para a libertação das enzimas proteases e lipases que auxiliam no desenvolvimento do aroma e do sabor (Kloos & Schleiffer, 1986).

De acordo com Kloos e Schleifer (1986) aproximadamente 80 % das estirpes de *S. xylosus* têm capacidade de reduzir os nitratos, e cerca de 40 % a 70 % evidência atividade lipolítica mas muitas não apresentam atividade proteolítica.

Além destas características, *S. xylosus* tem a propriedade de não formar aminas biogénicas e de ser bacteriostática contra microrganismos patogénicos (Gardini, Martuscelli, Crudele, Paparella & Suzzi, 2002). Martín, Colin, Aranda, Benito & Córdoba (2006) referem ainda a capacidade de *Staphylococcus xylosus* em produzir

substâncias inibidoras do desenvolvimento de *Listeria monocytogenes* e outras bactérias Gram-positivas.

2.2.1.2. *Staphylococcus carnosus*

A designação de *S. carnosus* foi proposta pela primeira por Schleifer & Fischer (1982). Probst *et al.*, (1998) citados por Euzéby (2013) classificaram o *S. carnosus* em três grupos: *S. condimentii* pertencente ao grupo F, *S. carnosus* subespécie *carnosus* e a subespécie *utilis* pertencentes aos grupos A e B, respetivamente. Estes últimos apresentam uma similaridade superior a 73 % pelo que foram consideradas como um só grupo (Tanasupawat, Hashimoto, Ezaki, Kozaki & Komagata, 1991).

Staphylococcus carnosus são cocos com 1µm de diâmetro que ocorrem predominantemente aos pares ou individualmente, as suas colónias são branca-acinzentadas com cerca de 1 a 2 mm de diâmetro. Estas estirpes crescem bem à temperatura de 15 °C a 45 °C e toleram concentrações de NaCl superior a 15 % (Schleifer & Fischer, 1982, Carvalho, 2010).

2.2.1.3. *Staphylococcus equorum*

Staphylococcus equorum foi a nomenclatura proposta por Scheifer, Kilpper-Balz e Devriese em 1984 (Euzéby, 2013). São conhecidas duas subespécies de *S. equorum*: a subespécie *equorum* e a subespécie *linens*, caracterizados e isolados por Place, Hiestand, Gallmann e Teuber (2003) em queijos franceses com fermentação natural.

S. equorum são cocos de 0.8 a 1.5 µm de diâmetro, formando colónias 1 a 6 mm de diâmetro, geralmente brancas, opacas e por vezes hemolíticas. A temperatura ótima de crescimento é de 30 a 32 °C entretanto não evidenciam crescimento a temperatura de 42 °C (Carvalho, 2010).

Ambas as subespécies de *S. equorum* são redutoras de nitrato e produtoras de ácido pela frutose, D-manose e D-glucose. A diferença entre as duas subespécies é o facto de que a subespécie *equorum* fermenta o manitol, enquanto a subespécie *linens* não (Place *et al.*, 2003).

Tal como *S. xylosus*, *S. equorum* têm a capacidade para produzir substâncias inibidoras do desenvolvimento de *Listeria monocytogenes*, tais como o peróxido de hidrogénio, ácidos orgânicos e algumas enzimas (Place *et al.*, 2003).

2.2.1.4. Outros

Em relação ao *Staphylococcus saprophyticus*, são conhecidas duas subespécies: a subespécie *saprophyticus* e a subespécie *bovis*. Segundo Hajek *et al.*, (1996) as

subespécies diferenciam-se entre si, pela capacidade que esta última tem de reduzir o nitrato, produzir pirrolidonil arilamidase e de fermentar a galactose e ribose. Entretanto, a subespécie *bovis* não apresenta capacidade de hidrolizar esculina e amido, ao inverso da subespécie *saprophyticus*.

Propriedades como o tamanho da célula, a redução de nitratos, a produção de urease e ácido a partir de ribose, celobiose, rafinose e xilose e a impossibilidade de hidrolizar esculina, são úteis para a identificação e distinção entre a subespécie *bovis* e outras espécies estafilocócicas, como *S. equorum* e *S. xylosus* (Hajek *et al.*, 1996).

Estas espécies apresentam um ótimo crescimento a temperatura entre 28 a 35 °C e em concentrações de 10 % de cloreto de sódio.

Staphylococcus epidermidis apresentam capacidade de produzir proteases, lipases, fosfolipases, estearases, lipases lipoproteínas e desoxirribonucleases, não tendo capacidade de fermentar o manitol (Baird Parker 1963, citado por Schleifer, 1986). Estes microrganismos evidenciam um excelente crescimento em meios com concentração de até 7.5 % de cloreto de sódio, e um fraco crescimento em 10 % de cloreto de sódio (Kloos & Schleifer, 1975).

S. saprophyticus e *S. epidermidis* têm sido espécies-alvo de muitos estudos, devido a possibilidade de causarem processos infecciosos (Zell *et al.*, 2008).

Staphylococcus simulans caracteriza-se pela capacidade de produzir lipases e estearases, fermentar e produzir elevados níveis de manitol intracelular (comparativamente ao *S. xylosus*) e pela incapacidade de hidrolisar a caseína ou gelatina (Schleifer, 1986).

2.3. Culturas de arranque (*Starters*)

A fermentação dos enchidos ocorre de forma natural ou através da utilização de culturas de arranque, também denominadas *starters*.

Nos processos tradicionais onde não são adicionadas culturas *starters*, os microrganismos responsáveis pela fermentação espontânea têm origem na própria carne ou são provenientes do meio ambiente fabril (Mauriello, Casaburi, Blaiotta & Villani, 2004), constituindo a denominada "microbiota de casa" (García-varona *et al.*, 2000). A fermentação pode ocorrer ainda pela inoculação de uma pequena quantidade de massa com características consideradas ideais e usada num fabrico prévio, servindo para reiniciar outro processo de fermentação (Harris, 1998 citado por Leroy & De Vuyst, 2004). No entanto, por esse mecanismo não é possível assegurar que o número e as

estirpes de microrganismos presentes na matéria-prima sejam sempre o mesmo e se comportem da mesma maneira (Martín, Colín, Aranda, Benito & Córdoba, 2007).

Com a necessidade de fabricar produtos seguros, com propriedades tecnológicas desejáveis e padronizadas, resultou o uso de culturas *starters* para a produção de enchidos fermentados, por um processo em que há controlo da fermentação, da maturação e ainda da inibição do crescimento e da atividade de microrganismos indesejáveis (Drosinos *et al.*, 2005).

A seleção e a identificação de bactérias para o uso como culturas de arranque tiveram início no século XX (Tabela 2). Principalmente após 1950, estudos mais intensificados possibilitaram a sua introdução como cultura de arranque.

Tabela 2: Dados históricos sobre o desenvolvimento das culturas de arranque (Giolitti, 1967 e Hammes *et al.*, 1995 citado por Hammes 2012)

1902	Van der Slooten: Isolou estafilococos, estreptococos e bacilos a partir de carne fermentada;
1921	Kurk: Patenteou um processo de cura, onde utilizava estirpes de <i>Micrococcus</i> , não putrefactivos, não patogénicos e nitrato-redutores;
1924	Schönberg: Descreveu que os <i>Micrococcus</i> crescem na carne fermentada, afetando o sabor e a cor vermelha;
1940	Jesen e Paddock: Destacaram a ação positiva da inoculação de <i>Lactobacillus</i> na produção de enchidos fermentados, com o objetivo de encurtar o tempo de cura;
1950	Niinivaara: Introduziu a primeira cultura de arranque na Europa, uma estirpe do género <i>Micrococcus</i> (M ₅₃), que promoveu uma melhoria na cor e no aroma dos enchidos e inibiu o crescimento de bactérias indesejáveis;
1966	Nurmi: Desenvolveu a primeira cultura mista, composta por <i>Micrococcus</i> e <i>Lactobacillus</i>
1967	Reuter: Destacou que as Bactérias Ácido Lácticas predominantes na fermentação são “ <i>Lactobacillus</i> atípicos” (<i>L.sakei</i> , <i>L.curvatus</i>);
1981	Fischer: Descreveu os <i>Staphylococcus</i> (<i>S.carnosus</i> , <i>S.xylosus</i> , <i>S.saprophyticus</i>) e <i>M.varians</i> predominantes nos enchidos

As culturas *starters* podem ser definidas como uma preparação ou material que contém um grande número de microrganismos que se adiciona à matéria-prima com o objetivo de acelerar o processo de fermentação (Leroy & De Vuyst, 2004).

Para Hammes (1995, citado por Hammes & Hertel 1998), as culturas *starters* são preparações contendo microrganismos vivos ou inativados que se desenvolvem num substrato de fermentação com uma atividade metabólica desejada.

Atualmente, na indústria de salsicharia os microrganismos utilizados como culturas de arranque pertencem a quatro grandes grupos, entre eles, as Bactérias Ácido Lácticas (BAL), os Cocos Gram-positivos e Catalase-positivos (*Staphylococcus* e *Kocuria*), os bolores e as leveduras (Drosinos, Paramithiotis, Kolovos, Tsikouras & Metaxopoulos, 2007; Hammes & Hertel, 1998). Na Tabela 3 são indicadas as principais espécies utilizadas como *starters* nos produtos cárneos.

Tabela 3: Espécies microbianas utilizadas como starters em produtos cárneos (adaptado de Hammes & Hertel, 1998).

Bactérias ácido Lácticas	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. alimentarius</i> , <i>L. caseis</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. sakei</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Enterococcus</i>
Estafilococos Coagulase Negativa	<i>Staphylococcus xylosus</i> , <i>S. carnosus</i> (subespecie <i>carnosus</i> e <i>utilis</i>), <i>S. equorum</i>
Actinobactérias	<i>Kocuria varians</i> , <i>Streptomyces griseus</i> , <i>Bifidobacterium</i> sp
Halomonadáceas	<i>Halomonas elongata</i>
Enterobactérias	<i>Aeromonas</i> sp
Bolores	<i>Penicillium nalgiovense</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. camemberti</i>
Leveduras	<i>Debaromyces hansenii</i> , <i>Candida famata</i>

Para que possam ser utilizados como *starters*, os microrganismos devem cumprir determinados requisitos, designadamente: i) não ser patogénico; ii) não produzir químicos tóxicos, iii) ser de fácil manuseamento, armazenamento e transporte, iv) ser adequado ao período de fermentação do produto, v) ter estabilidade genética, vi) apresentar algum grau de resistência a fatores inibitórios presentes no produto fresco, vii) ter capacidade de se desenvolver concomitantemente com outros *starters*, viii) ter reprodutividade entre diferentes culturas e ix) não deteriorar o produto durante a sua maturação e armazenamento (Robinson, 2008 citado por Neves 2012).

Nos enchidos fermentados, o *Staphylococcus xylosus*, é a espécie com maior predominância (García-Varona *et al.*, 2000). No entanto, estão descritas outras espécies como *S. carnosus*, *S. equorum*, *S. simulans*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. cohnii*, *S. hominis*, *S. capitis* e *S. intermedius* (Blaiotta *et al.*, 2004; Casaburi, Blaiotta, Mauriello, Olimpia & Villani, 2005; Morot-Bizot, Leroy & Talon, 2006).

Os *starters* produzidos no Norte da Europa não se adaptam bem e nem sempre conseguem competir com a microbiota que coloniza os produtos industriais do Sul da Europa, resultando em perdas das características sensoriais (Leroy, Verluyten, & De Vuyst, 2006). De um modo geral, os produtos tradicionais de salsicharia são considerados de melhor qualidade quando comparados com aqueles que são inoculados com *starters*, devido às matérias-primas e as tecnologias utilizadas (Moretti *et al.*, 2004; Leroy *et al.*, 2006).

2.3.1. Propriedades tecnológicas das bactérias Estafilocócicas Coagulases Negativas usadas como *starters*

Das espécies microbianas referidas na Tabela 3, as BAL e as SCN são os mais importantes utilizados como *starters* nos produtos cárneos. As propriedades organoléticas dos produtos cárneos fermentados são devidas às atividades metabólicas destes microrganismos e às atividades das enzimas endógenas da própria carne (Martín, Colín, Aranda, Benito & Córdoba, 2007).

Os SCN desempenham um papel importante no desenvolvimento das propriedades sensoriais (cor, sabor, textura) através da atividade da nitrato-redutase, proteolíticas e lipolíticas (Mauriello, Casaburi, Blaiotta & Villani, 2004). Previnem a oxidação lipídica através da atividade da catalase e superóxido dismutase (Barrière *et al.*, 2001) e melhoram a segurança dos enchidos na medida em que podem produzir compostos antimicrobianos (Martín *et al.*, 2007).

2.3.1.1. Atividade nitrato redutase

A adição de nitratos e nitritos de sódio ou de potássio nos produtos cárneos fermentados auxiliam a formação e estabilidade da cor vermelha característica, atuam como agente antimicrobiano e interferem na melhoria do sabor e aromas típicos dos produtos (Sanz, Vila, Toldrá, Nieto & Flores, 1997). Por si só, os nitratos de sódio ou de potássio não são eficazes, tornando-se apenas eficientes após terem sido reduzidos a nitrito. Vários SCN, especialmente *S. xylosus*, *S. equorum*, *S. carnosus*, *S. epidermidis*, *S. lentus* e *S. simulans* possuem capacidade de nitrato redutase. Entretanto essa propriedade raramente se verifica no *S. saprophyticus*, *S. succinus* e *S. warneri* (Mauriello *et al.*, 2004).

A formação e a estabilidade da cor estão entre as características mais importantes de qualidade dos produtos de carne processadas e, logo de grande importância para a indústria da carne. A cor vermelha característica dos produtos cárneos resulta de uma série de reações químicas entre compostos derivados do nitrito/nitrato adicionados e da mioglobina ($MbFe^{II}$) que ocorre naturalmente. Esta reação conduz simultaneamente à formação da nitrosamioglobina, cor vermelha brilhante ($MbFe^{II}NO$), em que existe

uma ligação entre o NO e o íon ferro (Fe^{II}) central do grupo Heme (Møller & Skibsted, 2002 citado por Gøtterup *et al.*, 2007).

O nitrito funciona como uma garantia adicional para a saúde do consumidor, na medida em que contribui para a inibição de alguns microrganismos particularmente perigosos para o Homem, dos quais se destaca o *Clostridium botulinum* não alterando a flora tecnológica (Fraqueza, 2008).

A melhoria do sabor e aroma dos produtos cárneos fermentados pode ser atribuída ao efeito antioxidante que os nitritos (previamente reduzidos dos nitratos) têm sobre os lípidos. A inibição da oxidação lipídica realizada pelos nitritos estabelece-se por três mecanismos indiretos que podem operar simultaneamente: i) ligação ao grupo heme e prevenção da libertação de ferro catalítico; ii) ligação ao ferro não heme com inibição da catalase e/ou iii) estabilização dos lípidos oleofinicos contra a oxidação (Talon, Walter, Chartier, Barrière & Montel, 1999).

A importância da atividade nitrato redutase é de tal ordem que, alguns autores a destacam como sendo o primeiro critério de seleção de estirpes SCN a serem usadas como culturas *starters* (García-Varona *et al.*, 2000)

2.3.1.2. Atividade lipolítica e proteolítica

Várias substâncias aromáticas e ácidos orgânicos são libertados por meio da atividade de lipases e proteases exercidas pelos SCN. Essas atividades contribuem para o desenvolvimento do aroma, sabor e textura dos produtos cárneos fermentados, devido à formação de compostos de baixo peso molecular, incluindo peptídeos, aminoácidos, aldeídos, aminas e ácidos gordos livres (Mauriello *et al.*, 2004; Simonovà *et al.*, 2006).

A atividade lipolítica tem sido atribuída principalmente às lipases endógenas da carne (cerca de 70%) e parcialmente aos géneros de SCN (Zanardi, Ghidini, Battaglia, Chizzolini, 2004). As reações de lipólise que ocorrem nos enchidos conduzem a uma acumulação de ácidos gordos livres importantes no desenvolvimento de compostos responsáveis pelo aroma (Hammes & Hertel, 1998).

A atividade proteolítica é definida como sendo um conjunto de atividades enzimáticas relacionadas com a hidrólise das ligações peptídicas nas proteínas ou péptidos e tem sido atribuída principalmente à ação das enzimas endógenas e exógenas provenientes de microrganismos. As proteinases dividem-se em duas classes fundamentais, as endopeptidases e exopeptidases (aminopeptidases, carboxipeptidases), em função das zona da cadeia polipeptídica em que atuam: as endopeptidases atuam no interior da cadeia polipeptídica, e as exopeptidases atuam somente em regiões próximas da extremidade da cadeia polipeptídica (Moss, 2000).

Estas enzimas atuam de forma sequencial durante o fabrico dos enchidos. Primeiramente há atuação de endopeptidases com libertação de péptidos, estes por sua vez, sofrem a ação de exopeptidases, particularmente as aminopeptidases, responsáveis pela libertação de aminoácidos nos produtos cárneos (Flores, Marina, Toldra, 2000). Do ponto de vista tecnológico, estes fenómenos são importantes na produção de compostos aromáticos, que contribuem para a melhoria das propriedades organoléticas do produto final.

As enzimas endógenas da carne pertencem a dois grupos de peptidases, as calpaínas (I e II) ou proteases neutras ou proteases dependentes do cálcio e as catepsinas (B, D, H e L) ou proteases lisossomais (Toldrá, 2007).

A atividade destas enzimas depende de diversos fatores entre eles, a temperatura e o pH são os mais destacáveis. A subida da temperatura aumenta o grau de atividade das enzimas proteolíticas, enquanto a relação entre o pH e a proteólise variam de forma inversa, isto é, quanto mais baixo for o pH mais intensa é a proteólise (Fernández, 2000).

García-Varona *et al.*, (2000) consideram que os SCN participam ativamente nos fenómenos proteolíticos, provocando um aumento importante do teor de aminoácidos. Segundo Bonomo *et al.*, (2009) as espécies mais proteolíticas são, *S. xylosus*, *S. equorum*, *S. saprophyticus* e *S. succinus*.

2.3.1.3. Atividade da catálase e superóxido dismutase

A atividade da catálase e superóxido dismutase dos SCN são importantes na decomposição do peróxido de hidrogénio, impedindo assim a oxidação lipídica (Barrière *et al.*, 2001). O peróxido de hidrogénio é um metabólito comumente produzido por bactérias lácticas durante a fermentação dos enchidos, que pode provocar alterações na cor, no aroma, rancidez e redução da vida útil dos produtos (Hugas & Monfort, 1997). O excesso de oxidação pode atingir um nível de rancificação e originar produtos inaceitáveis para o consumidor, mas, antes de tal condição ser atingida, a oxidação lipídica pode gerar moléculas tóxicas com possíveis riscos para a saúde humana (Zanardi *et al.*, 2004).

A produção de superóxido dismutase tem sido detetada em algumas espécies de *Staphylococcus*, nomeadamente *S. xylosus* e *S. carnosus*, muito útil no controlo da oxidação lipídica dos produtos cárneos (Talon, Barrière & Centeno, 2000).

Pelas razões expostas, Mauriello *et al.*, 2004, recomendam o uso de estirpes de SCN com alta atividade de catalase, para ajudar a prevenir o desenvolvimento de sabores estranhos gerados pela oxidação de lípidos durante a maturação.

2.3.1.4. Capacidade de crescerem em diferentes condições de temperatura, pH e concentração de NaCl

Diversos fatores, incluindo os ambientais, podem afetar a atividade e estabilidade das culturas *starters*, tais como: temperatura, concentração de cloreto de sódio, pH, humidade relativa, características da matéria-prima, alguns aditivos e ingredientes (Stahnke & Tjener, 2007).

Estudos realizados por Mauriello *et al.*, 2004 e Casaburi *et al.*, 2005 demonstraram que *Staphylococcus carnosus* e *Staphylococcus simulans* crescem a temperatura de 15 °C e 20 °C (temperatura normalmente usada para a fermentação), na presença de 10 %, 15 % e 20 % de NaCl, bem como em valores de pH de 5 e 5,5.

O *S. xylosus* revelaram um crescimento ótimo a 30 °C, pH 5.5 e 20 % NaCl, embora, tenham crescido também a temperatura de 10 °C e 20 °C, na presença de 10 % e 15 % NaCl e pH 4 e 5 (Essid, Ismail; Ahmed, Ghedamsi & Hassouna, 2007). Entretanto Bonomo *et al.*, 2009 mostram que os *Staphylococcus* não cresceram bem a temperatura de 10 °C.

A tolerância dos SCN em meios ácidos é necessária para prevenir o desenvolvimento de agentes patogénicos durante a produção de enchidos fermentados (García-Varona *et al.*, 2000).

2.3.2. A segurança alimentar e o uso das bactérias estafilocócicas como culturas *starters*

Os SCN selecionados para o uso como culturas *starters* na indústria alimentar devem ser seguros do ponto de vista microbiológico e toxicológico. Portanto, a capacidade de produzir aminas biogénicas e nitrosaminas são critérios importantes a ser considerados na escolha destes microrganismos. Também é essencial que as estirpes de SCN não produzam enterotoxinas e nem transportem genes de resistência a antibióticos.

Estes aspectos de segurança dos *starters* são de extrema importância e tem gerado ainda mais atenção com a introdução da avaliação de risco pela *European Food Safety Authority* (EFSA) para os microrganismos utilizados na cadeia alimentar com fins tecnológicos. Uma grande preocupação que tem tido destaque no conceito de *Qualified Presumption of Safety* (QPS), semelhante ao sistema *Generally Recognized as Safe* (GRAS) nos EUA, é a presença de genes transferíveis de resistência a antibióticos, bem como a produção de toxinas ou aminas biogénicas no produto final.

2.3.2.1. Formação de aminas biogénicas e nitrosamina

As aminas biogénicas são compostos orgânicos nitrogenados de baixo peso molecular, usualmente encontradas em diferentes alimentos (enchidos secos, produtos da pesca, queijos, vegetais) e sintetizadas no metabolismo microbiano, vegetal e animal, formadas principalmente pela descarboxilação de aminoácidos (Silla-Santos, 1996; Bover-Cid *et al.*, 2001; EFSA, 2011). Estes compostos podem ser classificados em três grupos: aminas aromáticas (histamina, feniletilamina, tiptamina, tiramina e serotonina), diaminas alifáticas (putrescina e cadaverina) e poliaminas alifáticas (agmatina, espermina e espermidina). Em geral, a histamina, putrescina, tiramina, cadaverina, feniletilamina, espermina e espermidina são mais importantes em alimentos (Shalaby, 1996, citado por Suzzi & Gardini, 2003). Estes compostos, normalmente não representam um risco para a saúde humana, mas quando ingeridas em elevadas quantidades, podem ter efeitos nocivos e provocar náusea, diarreia, hipo e hipertensão, cefaleia, dilatação dos vasos sanguíneos, além de outros mais severos como intoxicação histamínica (Silla-Santos, 1996, Bover-Cid *et al.*, 2001; EFSA 2011). Os efeitos tóxicos das aminas biogénicas podem ser potencializados pela presença de outras aminas, ingestão de álcool, inativação de mecanismos de desintoxicação devido a deficiências genéticas, doenças gastrointestinais ou tratamentos com inibidores mono-aminoxidases (Bover-Cid *et al.*, 2001; EFSA, 2011).

O crescimento da população microbiana, a acidificação, o grau de proteólise, o uso de aditivos, a disponibilidade de aminoácidos livres, pH entre 5 e 7, a atividade da água reduzida, a temperatura entre 20 e 37 °C e a presença de substrato alvo da descarboxilação nos produtos cárneos fermentados secos proporcionam condições favoráveis à formação de aminas biogénicas (Silla-Santos, 1996).

A produção de aminas biogénicas na carne e nos produtos cárneos tem sido relacionada com uma variedade de microrganismos, incluindo enterobactérias, pseudomonas, lactobacilos, enterococos, carnobactéria e estafilococos (Vidal-Carou, Veciana-Nogués, Latorre-Moratalla & Bover-Cid, 2007). No entanto, existe muito pouca informação disponível sobre a capacidade dos SCN de produzir tais compostos, embora algumas estirpes produzam putrescina, tiramina, feniletilamina e histamina (Straub *et al.*, 1994 citado por Vidal-Carou *et al.*, 2007).

Segundo Martín *et al.*, (2006) o *S. xylosus*, *S. carnosus*, *S. warneri* e *S. epidermidis* são estipes aminogénicas, e a feniletilamina e tiramina são as aminas frequentemente produzidas.

As aminas podem reagir com o nitrito formando nitrosaminas, que são potencialmente carcinogénicas para o Homem. Os produtos cárneos curados ou fumados são frequentemente fontes de nitrosaminas, porque o seu processo de fabrico envolve

agentes nitrosantes como o nitrato e/ou nitrito e oxido de nitrogénio presente no fumo (Eerola *et al.*, 1997 citado por Vidal-Carou *et al.*, 2007). Contudo a formação de nitrosaminas nos alimentos pode ser controlada através da adição de níveis baixos de nitritos e pelo uso de ascorbato e eritorbato (Cassens, 1997 citado por Toldrá & Reig, 2007).

2.3.2.2. Envolvimento em processos infecciosos e produção de toxinas

Os Estafilococos coagulase negativa são comumente encontrados vivos na pele e nas membranas mucosas do Homem e animais de sangue quente. Porém, também podem ser isolados a partir de uma ampla variedade de géneros alimentícios como a carne, o queijo e o leite, e de fontes ambientais como o solo, a areia, o ar e a água (Kloos & Schleifer, 1986; Bonomo *et al.*, 2009). Apesar de serem considerados espécies não patogénicas para o homem, animais e alimentos, podem estar associados a processos infecciosos, nomeadamente infeções nosocomiais, mastites em ruminantes e intoxicações alimentares (Podkowik, Park, Seo, Bystrón & Bania, 2013).

Algumas SCN vulgarmente isolados nos produtos cárneos fermentados, nomeadamente *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* e *S. saprophiticus* são muitas vezes associados a vários processos infecciosos (Zell *et al.*, 2008).

Enquanto *S. xylosus* e *S. equorum* raramente estão envolvidos em casos clínicos (Irlinger, 2008), *S. carnosus* é considerado não patogénico e *S. warneri* como um patogénico problemático (Kloos & Schleifer, 1986).

Diversas espécies de *Staphylococcus* são capazes de produzir enterotoxinas (SEs), mas apenas o *S. aureus* (*Staphylococcus* coagulase positiva) é descrita como causadora de intoxicação alimentar.

Com base nas características antigénicas, nove tipos principais de enterotoxinas estafilocócicas foram relatados: cinco SEs clássicas (SEA, SEB, SEC, SED E SEE) e quatro SEs adicionais (SEG, SEH, SEI e SEJ), com os seus respetivos genes. Posteriormente outros genes adicionais (seK a seR e seU) que codificam as enterotoxinas foram descobertos, expandindo a família das SEs (Blaiotta *et al.*, 2004). Além disso, outras variantes foram relatadas para SEC, SEG, SEI e SEU. Todavia ainda não foi descrita nenhuma relação entre esses novos SEs com a intoxicação alimentar (Talon & Leroy, 2011).

Estudos recentes utilizando a técnica de PCR e /ou DNA *microarrays* revelaram que a ocorrência de genes SEs em SCN isolados de produtos cárneos, leite e queijos é muito raro. Não tendo sido encontrados genes de enterotoxinas em *S. xylosus*, *S. equorum* e *S. saprophyticus* (Blaiotta *et al.*, 2004; Even *et al.*, 2010).

Embora os SCN isolados nos alimentos não detenham variantes de genes de SEs, Talon e Leroy (2011) recomendam que não se pode omitir a sua existência.

2.3.2.3. Resistência a antibióticos

A ocorrência e disseminação de resistência das bactérias aos agentes antimicrobianos representam um sério problema do ponto de vista clínico e da saúde pública (Cocconcelli, 2007). Há relatos de que, o uso desses agentes na terapêutica, na profilaxia e na promoção do crescimento dos animais torna os seus produtos e derivados fonte para a resistência aos antibióticos na espécie humana, do mesmo modo que, determina o aumento da resistência nos microrganismos da microflora normal e bactérias patogênicas (Gutiérrez, García & Otero, 1990). Isto é, bactérias resistentes a antibióticos podem ser transmitidas dos animais para os humanos através da cadeia alimentar, podendo transferir genes de resistência às bactérias comensais presentes no trato gastrointestinal, assim como às bactérias patogênicas (Talon & Leroy, 2011).

As bactérias podem apresentar uma resistência natural ou adquirida a determinados antibióticos. A resistência natural (intrínseca) é uma característica inerente às espécies bacterianas que impedem a ação do antibiótico. Este tipo de resistência está presente em todas as estirpes de uma dada espécie e é expressa por genes cromossomais. A resistência adquirida pode ser devida a uma modificação genética do microrganismo, na qual estirpes resistentes surgem de populações bacterianas previamente sensíveis, geralmente após exposição ao agente antimicrobiano. A resistência adquirida pode ocorrer quer por mutações cromossomais ou por transferência horizontal de genes, isto é, por aquisição de genes de resistência anteriormente presente em bactérias da mesma espécie ou entre espécies diferentes. Estes genes estão normalmente situados em elementos móveis como por exemplo plasmídeos, transposões e integrões (Ammor, Flórez & Mayo, 2007; Todar, 2012).

A possibilidade de aquisição de genes de resistência a antibióticos é um fator de risco associado a todos os grupos de bactérias usadas como culturas *starters* nos produtos cárneos (Cocconcelli, 2007).

Estudos recentes demonstram que a resistência a antibióticos, incluindo resistência a alguns antibióticos de importância terapêutica, pode ocorrer tanto em *S.xylosus* e *S.carnosus* frequentemente isolados dos produtos cárneos fermentados, bem como em bactérias estafilocócicas consideradas oportunistas (*S. epidermidis*, *S. warneri* e *S. saprophyticus*) (Martin *et al.*, 2006).

De acordo com diversos autores (Resch, Nagel & Hertel, 2008; Simeoni *et al.*, 2008; Even *et al.*, 2010; Talon & Leroy, 2011; Marty *et al.*, 2012) as resistências a eritromicina, ampicilina, penicilina, tetraciclina e lincomicina são mais frequentemente encontradas nos SCN. Simeoni *et al.*, (2008) descreve multi-resistências (resistentes a duas ou mais classes de antibióticos) nos SCN isolados na carne e produtos cárneos fermentados. Todavia os SCN são sensíveis a vancomicina, gentamicina, cloranfenicol e rifampicina (Resch, *et al.*, 2008; Marty *et al.*, 2012).

3. Influência do sal, pH e temperatura no desenvolvimento de estafilococcus coagulases negativo isolados dos produtos cárneos fermentados

3.1. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo: I) contribuir para a classificação genotípica e fenotípica dos estafilococos isolados em diversos produtos cárneos fermentados, em diferentes fases de produção e superfícies de diferentes ambientes fabris; II) selecionar estirpes com características de segurança apropriadas nomeadamente isenção de resistências a antibióticos para serem utilizadas como *starters* na produção de enchidos; III) avaliar a capacidade de alguns elementos selecionados, para crescerem em diferentes concentrações de Cloreto de sódio, pH e temperatura.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Origem dos isolados em estudo

O trabalho experimental foi concretizado a partir de uma coleção de isolados de Estafilococos Coagulase Negativa (n=61), sendo 18 pertencentes à espécie *Staphylococcus equorum* e 43 à espécie de *Staphylococcus xylosus*, provenientes de quatro unidades fabris diferentes situadas no Alentejo (A, B, C e D) e de uma diversidade de enchidos tais como chouriço, chouriço de vinho, paio, chourição, salsichão grosso, linguiça e paio. As amostras foram colhidas em diferentes fases de produção e superfícies do ambiente fabril que contactam com os produtos durante o seu fabrico.

A avaliação genotípica e fenotípica dos isolados em estudo foi acompanhada pela utilização em paralelo de estirpes provenientes de colecções reconhecidas como *Staphylococcus xylosus* ATCC 8166, *Staphylococcus equorum* DSMZ 20029, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

3.3. Caracterização genotípica

3.3.1. Preparação do material e cultura dos isolados em estudo

Os isolados encontravam-se conservados a 80 °C negativos, em criotubos contendo caldo composto por Brain Heart Infusion (BHI, Scharlau, Espanha) e suplementado com 15 % de Glicerol (Merck, Alemanha). Antes da utilização, as culturas conservadas foram descongelados à temperatura ambiente e semeadas cerca de 10 µl de inóculo em placas com Manitol Salt Agar (MSA, Scharlau, Espanha) suplementado com gema

de ovo (Oxoid, Inglaterra). Estas placas foram a incubar a 37 °C durante 24 horas em aerobiose.

Das culturas frescas obtidas efectuou-se a extração do DNA genómico das bactérias e testes de sensibilidade aos antibióticos de todas os isolados em estudo.

3.3.2. Extração do ácido desoxiribonucleico (DNA)

O DNA dos isolados seleccionados foi extraído, recorrendo ao método do Tiocinato de Guanidina, previamente descrito por Pitcher *et al.*, 1989.

A partir da cultura bacteriana, procedeu-se à extração do DNA genómico. Com o auxílio de uma ansa de 10 µl retirou-se uma unidade formadora de colónia e suspendeu-se em 1 ml de TE 1x (10 mM Tris, 1 mM EDTA) em *ependorfs* de 2ml, após agitação no vórtex foi para centrifugar a 8000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Desprezou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se o pellet resultante em 250 µl de TE 1x com lisozima (10 mg/ml a -20 °C) e incubou-se a 37 °C durante 2 horas. Obtendo-se assim a lise das células bacterianas.

Seguiu-se a adição de 500 µl de GES (5 M tiocinato de guanidina, 0,1 M de EDTA e 0,5% (v/v) sarcosil) e agitou-se por inversão. Após a lise celular, foram adicionados 250 µl de acetato de amónio refrigerado a 10 M, misturados e incubados em gelo durante 10 minutos. De seguida pipetou-se 1 ml de clorofórmio/álcool amílico (24:1) agitado-se vigorosamente. Posteriormente os *ependorfs* foram centrifugados a 13.000 rpm, a 4 °C durante 10 minutos.

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, no qual foram adicionados aproximadamente 1 ml de isopropanol refrigerado, e os *ependorfs* foram homogeneizados por inversão observando-se a formação de um novelo, seguido de centrifugação sobre as condições descritas anteriormente.

Desprezado o sobrenadante, foi adicionado etanol a 70 % ao DNA contido no *ependorf* e novamente centrifugado. Finalmente o sobrenadante foi desprezado e o *ependorf* virado para completa secagem. Após a secagem o DNA foi ressuspensão com 150 µl de solução tampão TE 1x (10 mM Tris, 1 mM EDTA) e armazenado a 4 °C.

3.3.3. Método PCR *fingerprinting*

Para a análise dos *Staphylococcus equorum* e *Staphylococcus xylosus* por reações polimerase em cadeia (PCR) *fingerprinting* foi utilizada a seguinte sequência de *primers*: GTG₅ (5,-GTG GTG GTG GTG GTG -3). O processo de amplificação do DNA decorreu no termociclador com um volume final de 25 µl, sendo que 1 µl é da amostra e 24 µl foi de uma mistura master contendo 2,5 µl de Tampão (10x) (500 mM KCL,

Tris-HCL 100 mM, pH 8.3), 3,0 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), 200 µM de desoxiribonucleosidos trifosfato (dntp's), 2 mM do primer (GTG)₅ e 0,2 U de Taq DNA polimerase (Nzytech, Portugal).

No termociclador a reação de PCR foi submetida a 95 °C por 5 minutos para a desnaturação inicial do DNA seguida de 40 ciclos, de 1 minutos a 95 °C para a desnaturação do DNA, 2 min a 40 °C, para a ligação (*annealing*) dos *primers*, e 2 min a 72 °C para a extensão, seguida de finalização a 72 °C durante 10 minutos e refrigeração a 4 °C.

Em todas as reações de PCR foram utilizados controlos positivos. Como controlo positivo foram utilizadas estirpes de referência obtidas de coleções reconhecidas: *Staphylococcus xylosus* ATCC 8166 e *Staphylococcus equorum* DSMZ 20029. Como controlo negativo usou-se água Sigma.

3.3.3.1. Electroforese dos produtos amplificados

Foram retirados 10 µl do produto final resultante do PCR para realização de eletroforese (80V durante 75 minutos) em gel de agarose a 1,5 % com TBE 1x (10 mMTris, 1 mM EDTA), aos quais foram adicionados 2 µl de tampão bromofenol e 2 µl de Gel Red. Concomitantemente, com os produtos PCR aplicou-se 5 µl de marcador DNA molecular (100 pb) (Nzytech, Portugal). A visualização dos fragmentos amplificados foi efetuada num transiluminador de luz ultravioleta (Pharmacia Biotech, Alemanha) com realização de fotografia e gravação de imagem para posterior tratamento dos resultados.

3.4. Caracterização fenotípica

3.4.1. Testes de sensibilidade a antibióticos (TSA)

Todos os isolados em estudo foram submetidos a testes de sensibilidade a antibióticos pelo método de difusão em disco. Para isso, transferiu-se 4 a 6 colónias de cada um dos isolados crescidos em MSA, para o meio Triptona Soja Agar (TSA, Scharlau, Espanha) e incubou-se a 37 °C durante 24 horas. O inóculo desenvolvido, foi diluído em soluto fisiológico estéril, até obter uma concentração equivalente a 0,5 na escala MacFarland.

A suspensão dos isolados a testar foi semeada de forma homogénea com o auxílio de uma zaragatoa à superfície do meio Muller-Hinton Agar (Scharlau, Espanha) e com uma pinça esterilizada, foram colocados os discos contendo os seguintes antibióticos; Vancomicina (30 µg), Penicilina G (10 UI), Eritromicina (15 µg), Tetraciclina (30 µg),

Gentamicina (10 µg), Daltopristina/Quinupristina (15 µg) Rifampicina (5 µg), Lincomicina (15 µg) e Cloranfenicol (30 µg).

As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas. Passado esse período observou-se a formação de halos de inibição, os quais foram medidos em milímetros registrando-se os diâmetros dos halos formados para cada um dos 9 antibióticos em cada um dos isolados testados. Os resultados obtidos foram classificados em resistentes ou sensíveis de acordo com os critérios estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008) e *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2013).

Na Tabela 4 encontram-se listadas os grupos de antibióticos com as respectivas concentrações dos discos utilizados e sua categorização em relação a susceptibilidade. Para o controle de qualidade, foram usados o *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e o *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Tabela 4: Lista dos grupos de antibióticos em testes, respectivas concentrações *cut-off* points utilizados como critério de classificação da susceptibilidade.

Classes	Antibióticos	Abreviatura	Concentração do disco	Resistente (mm)	Sensível (mm)
Penicilinas	Penicilina	P	10 UI	≤ 28	≥ 29
Aminoglicosídeos	Gentamicina	CM	10 µg	≤ 13	≥ 18
Ansamícinas	Rifampicina	RA	5 µg	≤ 16	≥ 20
Tetraciclina	Tetraciclina	TE	30 µg	≤ 14	≥ 19
Fenicois	Cloranfenicol	C	30 µg	≤ 12	≥ 18
Macrolídeos	Eritromicina	E	15 µg	≤ 13	≥ 23
Glucopéptidos	Vancomicina	VA	30 µg	-	≥ 15
Lincosamidas	Lincomicina	MY	15 µg	≤ 14	≥ 21
Estreptograminas	Quinupristina/ Daltopristina	QD	15 µg	≤ 19 ^(a)	≥ 22 ^(a)

CLSI (2008); EUCAST (2013) ^(a)

3.5. Critérios de seleção dos isolados para a determinação do efeito da temperatura, NaCl e pH

Os critérios de seleção a ter em conta foram a sensibilidade aos antibióticos testados, tendo sido selecionados apenas os isolados com ausência de resistência a antibióticos e em alguns casos com resistência a apenas um antibiótico.

Com base no perfil genético obtido por PCR *fingerprinting* foram escolhidos exemplares dos grupos de clones de estirpes com perfis genéticos diferentes, de cada espécie e de acordo com a origem da amostra.

3.6. Determinação do efeito da Temperatura, NaCl e pH no crescimento dos *Staphylococcus*

Os *Staphylococcus* selecionados foram testados quanto à sua capacidade de se desenvolverem em diferentes temperaturas, valores de pH e concentração de NaCl.

O crescimento foi avaliado à temperatura de incubação de 7 °C, 15 °C e 25 °C em caldo BHI Broth (constituído por 12,5 % de extrato de cérebro, 5 % de extrato de coração, 10 % de peptose, 2% dextrose, 0,5 % de cloreto de sódio e 2,5 % de difosfato de sódio a pH final de 7,4) (Scharlau, Espanha). O efeito do NaCl no crescimento dos *Staphylococcus* selecionados foi determinado em BHI Broth (Scharlau, Espanha), suplementado com 2 %, 4 % e 6 % de cloreto de sódio (Scharlau, Espanha). Finalmente o efeito do pH foi avaliado em BHI Broth ajustando os valores de pH de 4,5; 5,5 e 6,5 pela adição de HCL (0,1 N).

Para este estudo utilizou-se uma cultura de 24 horas de cada um dos *Staphylococcus* selecionados e preparou-se uma suspensão em caldo BHI Broth (Scharlau, Espanha) de forma a obter uma absorvância de aproximadamente 0,100A, medida no espectrofotômetro a 600 nm. A suspensão inicial foi diluída a 10^{-3} e semeou-se 1ml destas diluições em meio MSA. Estes foram submetidos a incubação durante 24 horas a 37 °C, período após o qual se efetuou a contagem das unidades formadoras de colônias.

Cem microlitros (100 µl) de meio de cultura BHI Broth (Scharlau, Espanha) com as diferentes condições de pH e NaCl acima descritas foram distribuídos em microplacas de 96 poços, estes foram posteriormente inoculados com 10 µl da suspensão inicial, em duplicado nos respetivos meios. Após a inoculação fez-se a leitura das absorvâncias iniciais (tempo 0) das microplacas no espectrofotômetro a um comprimento de onda de 600 nm (OD_{600}). As microplacas foram incubadas nas diferentes condições de temperatura (7°C, 15°C e 25°C) e efectuaram-se novas leituras de absorvância das suspensões no espectrofotômetro (OD_{600}), inicialmente 6h após o tempo 0h e seguidamente de 12 em 12 horas durante 3 dias (72 horas).

3.7. Análise estatística

Os resultados obtidos dos Testes de sensibilidade aos antibióticos foram analisados utilizando o programa *Microsoft Office Excel* (versão 2007), para a determinação das percentagens e apresentação gráfica das sensibilidades e resistências dos isolados aos nove antibióticos testados.

A análise dos perfis genéticos das estirpes resultantes do método de PCR *Fingerprinting* foi efetuada com recurso ao programa *Bionumerics Applied Maths*

(versão 6.6, Bélgica), permitindo a construção de dendograma e a determinação das percentagens de semelhança entre as estirpes estudadas, utilizando o coeficiente de *Dice*.

Os dados da densidade ótica foram analisados utilizando o “PROC MIXED” of SAS 9.3 (SAS Inc.). O modelo utilizado inclui os fatores fixos do pH e NaCl e suas interações de forma independente para cada uma das 3 temperaturas testadas. O tempo foi tratado como variável contínua testando-se o seu efeito linear e quadrático. As observações de densidade ótica ao longo do tempo foram incluídas no modelo como medidas repetidas utilizando uma estrutura de covariância não estruturada (“Type=unstructure”). Os coeficientes dos modelos lineares ou quadráticos ajustados para cada nível de fator fixos e suas interações foram estimados, testando-se se eram significativamente diferentes de zero e se diferiam entre si, utilizando o comando “estimate” do “PROC MIXED”. Os modelos resultantes foram apresentados graficamente.

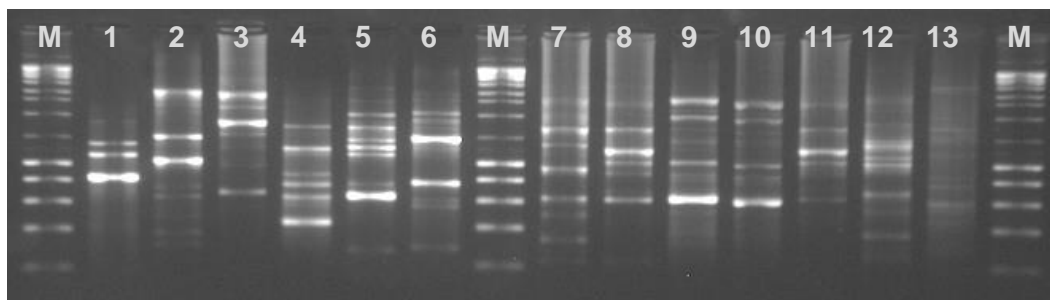
4. RESULTADOS

4.1. Caracterização genotípica das estirpes

4.1.1. PCR *fingerprinting*

A Figura 1 apresenta o resultado obtido da reacção de PCR *fingerprinting* de alguns isolados de *Staphylococcus* alvo de estudo, após a visualização dos fragmentos amplificados sobre transiluminação com luz ultravioleta.

Figura 1: PCR *fingerprinting* de alguns isolados de *Staphylococcus equorum* em estudo.



Legenda: M-Marcador, 1-P1B6, 2-Cv1C1, 3-C2C8, 4-Ch3C2, 5-SG3C3, 6-SG3C6, 7-P2B2, 8-Cv2C2, 9-Cv2C3, 10-Cv2C4, 11-CV3C2, 12-SG3C7, 13- *S. equorum* (DSMZ 20029).

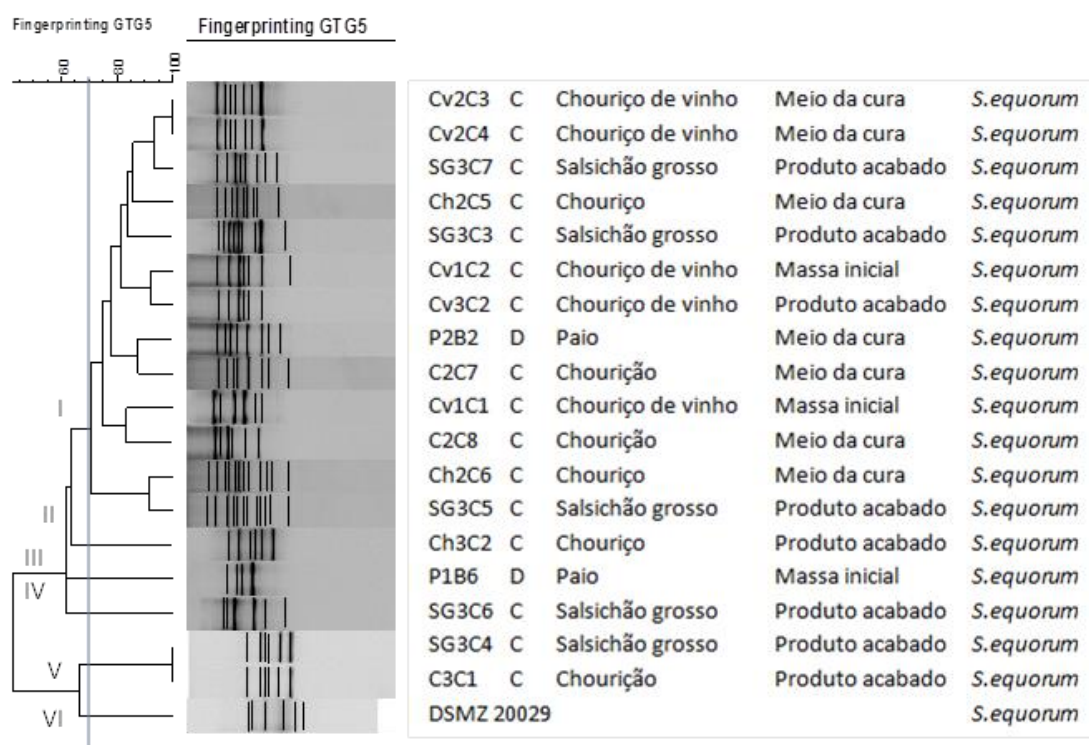
Nas Figuras 2 e 3 estão representados os dendogramas resultantes dos produtos de reacção do PCR *fingerprinting* com o primer de repetição GTG5, onde todas os isolados em estudo foram aplicados após análise no programa *Bionumerics Applied Maths*.

Da análise do perfil genético das estirpes de *Staphylococcus equorum* apresentadas na Figura 2 estabeleceram-se seis grupos com semelhança de aproximadamente

70%: I) Cv1C3, Cv2C4, SG3C7, Ch2C5, SG3C3, Cv1C2, Cv3C2, P2B2, C2C7, Cv1C1, C2C8, Ch2C6 e SG3C5; II) Ch3C2; III) P1B6; IV) SG3C6; V) SG3C4 e C3C1; VI) DSMZ 20029.

As estirpes Cv2C3 e Cv2C4 provenientes da unidade C, recolhidas de chouriço de vinho no meio da cura são idênticas, apresentando perfis genéticos com uma semelhança entre si de 100 %, assim como as estirpes C3C1 e SG3C4 colhidas no produto acabado.

Figura 2: Dendrograma da análise do perfil genético de estirpes *Staphylococcus equorum* obtidos por PCR Fingerprinting.

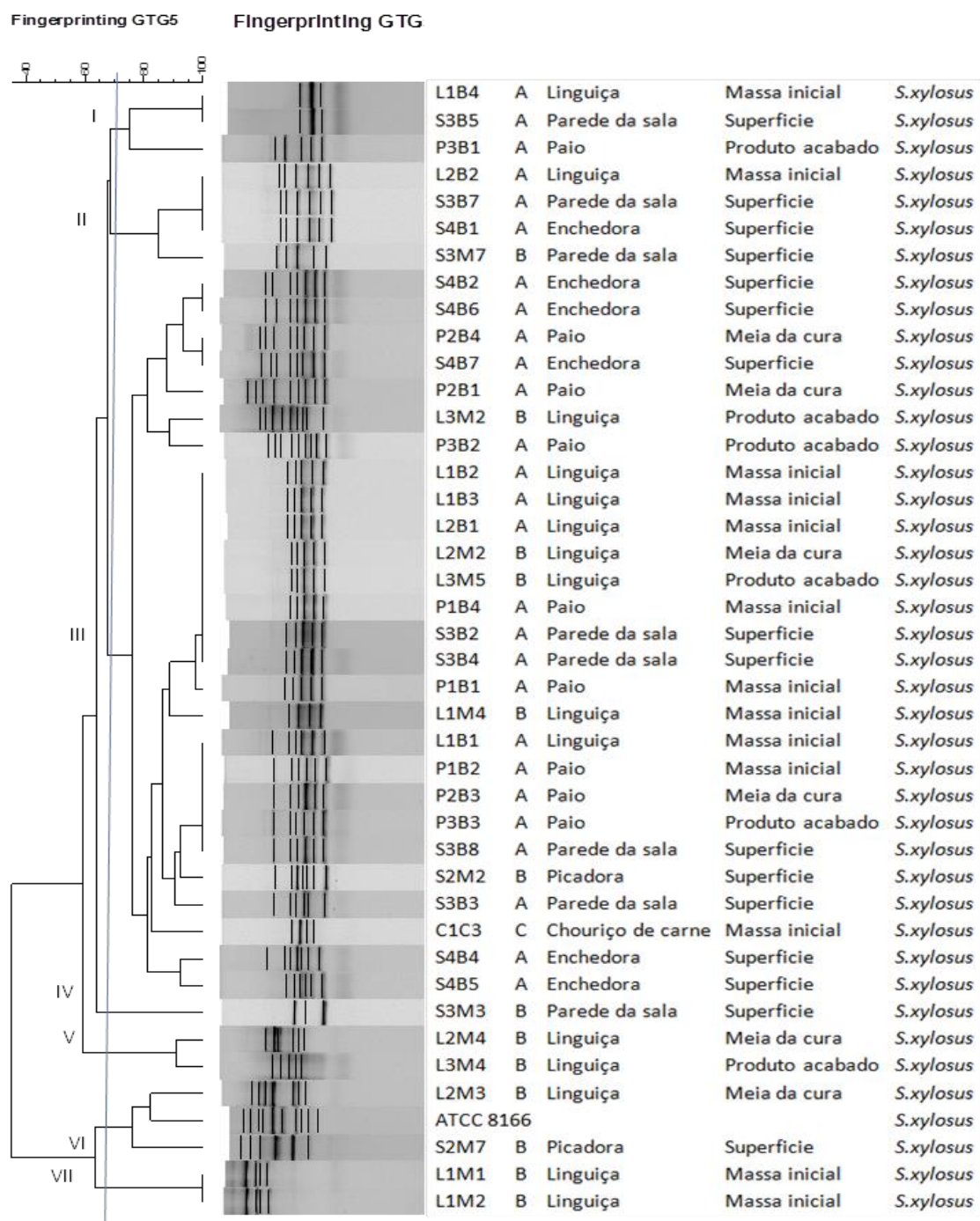


Legenda: Letras C e D correspondem as Unidades fabris

Pela análise da Figura 3, que apresenta o perfil genético das estirpes de *Staphylococcus xylosus* estudadas estabeleceram-se sete grupos com semelhanças de aproximadamente 70%: I) L1B4, S3B5 e P3B1; II) L2B2, S3B7, S4B1 e S3M7; III) S4B2, S4B6, P2B4, S4B7, P2B1, L3M2, P3B2, L1B2, L1B3, L2B1, L2M2, L3M5, P1B4, S3B2, S3B4, P1B1, L1M4, L1B1, P1B2, P2B3, P3B3, S3B8, S2M2, C1C3, S4B4 e S4B5; IV) S3M3; V) L2M4 e L3M4; VI) L2M3, S2M7 e ATCC 8166; VII) L1M1 e L1M2. Nem todos os grupos obtidos dos dendogramas permitiram relacionar por completo os isolados com a unidade fabril de onde foram provenientes, nem com o tipo de enchido ou fase de produção. Entretanto alguns isolados pertencentes ao mesmo grupo, provenientes do mesmo local podem ser considerados clones na medida em que

apresentam 90 a 100% de semelhança, como por exemplo: as estirpes L1B4 e S3B5 (grupo I) e L2B2, S3B7 e S4B1 (grupo II) oriundas da Unidade Fabril A; as estirpes L1B2, L1B3 e L2B1 (grupo III) ambas recolhidas na massa inicial da linguiça, também procedente de Unidade Fabril A; ou as estirpes L1M1 e L1M2 (grupo VII) provenientes da Unidade Fabril B, colhidas na massa inicial da linguiça.

Figura 2: Dendrograma da análise do perfil genético de estirpes *Staphylococcus xylosus* obtidos por PCR *fingerprinting*.



Legenda: Letras A, B e C correspondem as Unidades fabris

4.2. Caracterização fenotípica das estirpes

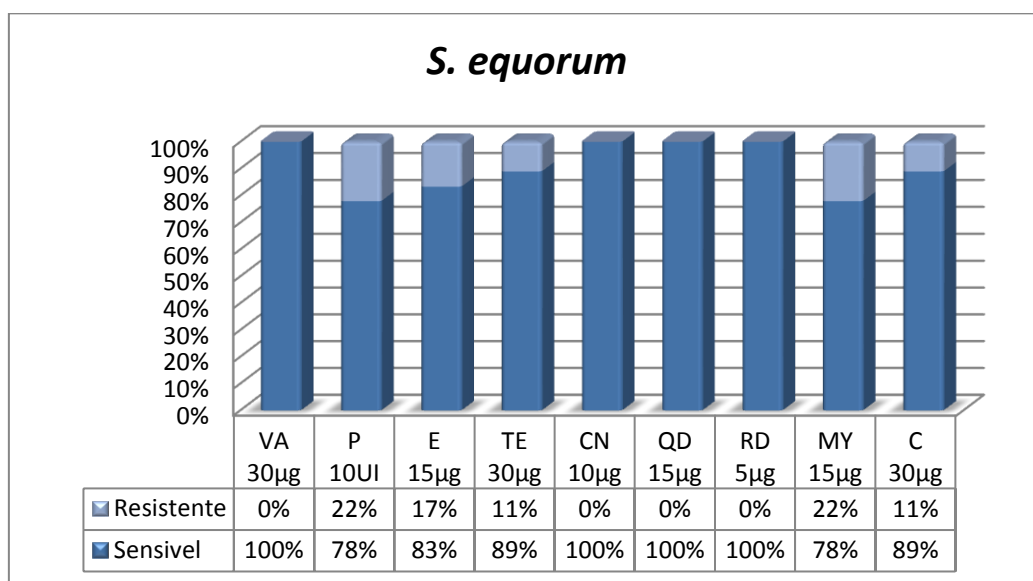
4.2.1. Testes de sensibilidade a antibióticos

Na Figura 4 e 5 estão apresentados os resultados referentes aos testes de sensibilidade aos antibióticos (Vancomicina (30 µg), Penicilina (10 UI), Eritromicina (15 µg), Tetraciclina (30 µg), Gentamicina (10 µg) Daltopristina/Quinupristina (15 µg) Rifampicina (5 µg), Lincomicina (15 µg) e Cloranfenicol (30 µg)) das 18 estirpes de *Staphylococcus equorum* e das 43 estirpes de *Staphylococcus xylosus* em estudo. Sendo que as estirpes foram classificadas como sensíveis ou resistentes.

Dos 18 isolados de *Staphylococcus equorum* estudados, 91 % apresentaram sensibilidade e 9 % resistência aos nove antibióticos testados.

A Figura 4 representa as percentagens de resistência e sensibilidade dos isolados de *Staphylococcus equorum* aos antibióticos utilizados. Pode verificar-se que os isolados apresentaram um baixo nível de resistência à penicilina (22 %), tetraciclina (11 %), eritromicina (17 %), lincomicina (22 %) e cloranfenicol (11 %). Todavia todos os isolados foram sensíveis à vancomicina, gentamicina, daltopristina/quinupristina e rifampicina.

Figura 4: Percentagem de sensibilidades e resistências aos 9 antibióticos (vancomicina (VA 30 µg), penicilina (P 10 UI), eritromicina (E 15 µg), tetraciclina (TE 30 µg), gentamicina (CN 10 µg) daltopristina/quinupristina (QD 15 µg) rifampicina (RD 5 µg), lincomicina (MY 15 µg) e cloranfenicol (C 30 µg)) apresentados pelas estirpes de *Staphylococcus equorum*.



As estirpes P1B6, Cv1C2, Cv3C2, C3C1, Ch3C2, SG3C3, SG3C4, SG3C5, SG3C6 e SG3C7 foram sensíveis a todos os antibióticos estudados. Enquanto as restantes estirpes apresentam resistência a mais do que um antibiótico.

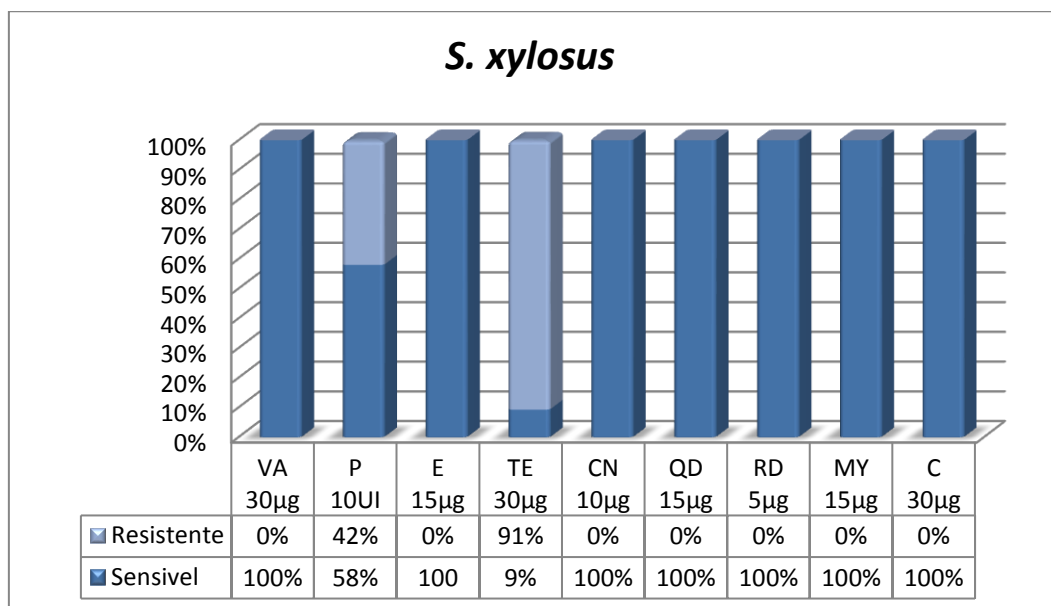
As estirpes Cv1C1, Cv2C3, Cv2C4 e C2C7 com resistência a apenas um antibiótico; mas as da C2C8 e P2B2 já têm resistência a dois antibióticos; a Ch2C5 com resistência a três antibióticos e a Ch2C6 tem resistência a quatro antibióticos.

As resistências aos antibióticos encontrados nos isolados de *Staphylococcus equorum* foram à penicilina (Cv2C3, Cv2C4, Ch2C5 e Ch2C6), lincomicina (P2B2, C2C7, C2C8 e Ch2C6), eritromicina (P2B2, Ch2C6 e C2C8), tetraciclina (Ch2C5 e Cv1C1) e cloranfenicol (Ch2C5 e Ch2C6).

Dos 43 isolados de *Staphylococcus xylosus* analisados, 83 % apresentaram sensibilidade e 17 % resistência aos antibióticos estudados.

Na Figura 5 estão representados em percentagens os perfis de resistências e sensibilidades dos isolados aos antibióticos. Pode observa-se que os isolados de *Staphylococcus xylosus* apresentam um alto nível de resistência apenas para tetraciclina (91 %) e penicilina (42 %). No entanto todos (100 %) mostraram sensibilidade a vancomicina, eritromicina, gentamicina, daltopristina/quinupristina, rifampicina, lincomicina e cloranfenicol.

Figura 5: Percentagens de sensibilidades e resistências aos antibióticos (vancomicina (VA 30 µg), penicilina (P 10 UI), eritromicina (E 15 µg), tetraciclina (TE 30 µg), gentamicina (CN10 µg) daltopristina/quinupristina (QD 15 µg) rifampicina (RD 5 µg), lincomicina (MY 15 µg) e cloranfenicol (C 30 µg)) apresentados pelas estirpes de *Staphylococcus xylosus*.



Todas as estirpes de *S. xylosus* foram resistentes a pelo menos um antibiótico com exceção de dois isolados (S3M3 e S3M5) que mostraram sensibilidade a todos os

antibióticos testados. As estirpes S2M7, S3M3, S3M5 e C1C3, foram as únicas que apresentaram sensibilidade à tetraciclina, sendo as restantes resistentes.

As estirpes L1M2, L1M4, L2M2, L3M5, S2M2, S3M3, S3M5, P1B2, P2B1, P3B1, P3B3, S3B2, S3B3, S3B7, S3B8, S4B2, S4B6 e S4B7 apresentaram sensibilidade à penicilina, sendo as restantes resistentes.

Os resultados da Tabela 5 relacionam a Unidade Fabril com a incidência de resistência a um ou mais antibióticos. Alguns dos *Staphylococcus equorum* provenientes da Unidade Fabril C demonstram resistência até 4 antibióticos de classes diferentes. Enquanto um isolado proveniente da Unidade D apresentou resistência a 2 antibióticos.

De notar que mais de metade dos *Staphylococcus xylosus* provenientes da Unidade Fabril A apresentam resistência a 2 antibióticos de classes diferentes.

Tabela 5: Relação entre a incidência de resistência aos antibióticos com a Unidade Fabril, dos isolados de SCN em estudo.

Espécies (n°)	Unidade Fabril	Total isolados resistentes (%)	Número antibióticos que apresentam resistência			
			1	2	3	4
<i>S.equorum</i> (16)	C	9%	4	1	1	1
<i>S.equorum</i> (2)	D			1		
<i>S.xylosus</i> (28)	A	17%	11	17		
<i>S.xylosus</i> (14)	B		6	6		
<i>S.xylosus</i> (1)	C		1			

4.3. Estirpes seleccionadas para o estudo do efeito da temperatura, NaCl e pH

Com base nos resultados obtidos dos testes de sensibilidade a antibióticos e do perfil genético obtido por PCR *fingerprinting* foram seleccionadas quatro estirpes de *Staphylococcus equorum* (Ch3C2, Cv1C2, P1B6 e SG3C5) e cinco estirpes de *Staphylococcus xylosus* (C1C3, L1M2, P1B2, S2M7 e S3M3) para avaliar o seu comportamento perante o efeito da temperatura, NaCl e pH.

4.3.1. Efeito da temperatura, NaCl e pH na multiplicação das estirpes de *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus equorum* selecionadas

4.3.1.1. Efeito da temperatura a 7 °C

As Figuras 6, 7 e 8 apresentam a multiplicação das estirpes de *Staphylococcus* estudadas, quando submetidas a uma temperatura de incubação de 7 °C, pH de 4,5; 5,5 e 6,5 e 2 %, 4 % e 6 % de NaCl, dada pela medição da densidade ótica de 600 nm de uma cultura que inicialmente continha aproximadamente 10^7 ufc/ml.

Das 9 estirpes de *Staphylococcus* estudadas apenas a C1C3 e a P1B2 apresentaram multiplicação significantiva da população inicial em 2 % NaCl e 4,5 de pH (Figura 6 A). A estirpe P1B2 evidenciou mulplicação a partir das 12 horas de incubação, aumentando a densidade ótica ao longo das 72 horas. A estirpe C1C3 resistiu às condições do meio mas com uma densidade óptica muito baixa.

A 4 % NaCl e pH 4.5 as estirpes L1M2, P1B2 e S2M7 apresentaram multiplicação contínua ao longo dos 3 dias (72 horas) (Figura 6 B). Na condição de pH 4,5 e 6 % NaCl somente a estirpe L1M2 evidenciou aumento significativo de população, ainda que baixo, ao longo dos 3 dias de incubação a 7 °C. De notar que todas as estirpes que aumentaram significativamente a população nestas condições (pH de 4,5 e em todas as concentrações de NaCl estudadas) são *Staphylococcus xylosus* (C1C3, P1B2, L1M2 e S2M7), sendo que nenhuma *Staphylococcus equorum* (Ch3C2, Cv1C2, SG3C5 e P1B6) resistiu a essa mesma condição.

A valores de pH de 5,5 e em todas as concentrações de NaCl (2 %, 4 % e 6 %) não ocorreu incremento significativo de nenhuma das estirpes, com a exceção da Ch3C2 e Cv1C2 que se desenvolveram em concentrações de 2 % NaCl (Figura 7 C).

Quando o valor de pH do meio era 6,5 e concentrações de NaCl de 2 % e 4 %, as estirpes Ch3C2 e Cv1C2 (*Staphylococcus equorum*) evidenciaram acréscimo significativo da população a partir das 12 horas, aumentando progressivamente até as 72 horas (Figura 8 D e E). Das estirpes de *Staphylococcus xylosus* apenas a S2M7 se multiplicou, apresentando um comportamento semelhante a estirpe Ch3C2 (*Staphylococcus equorum*) nas condições de 2 % NaCl e pH de 6,5.

A temperatura de incubação de 7 °C nenhuma estirpe apresentou capacidade de multiplicação e aumento significativo da população nas condições de pH 5,5 quando adicionados com 4 % e 6 % de NaCl, e nem a valores de 6,5 de pH com concentrações de 6 % NaCl.

Figura 6: Variação da densidade óptica de culturas de estirpes de *Staphylococcus xylosus* sobre efeito à temperatura de 7 °C e pH 4,5 a 2 % (A) e 4 % (B) de NaCl.

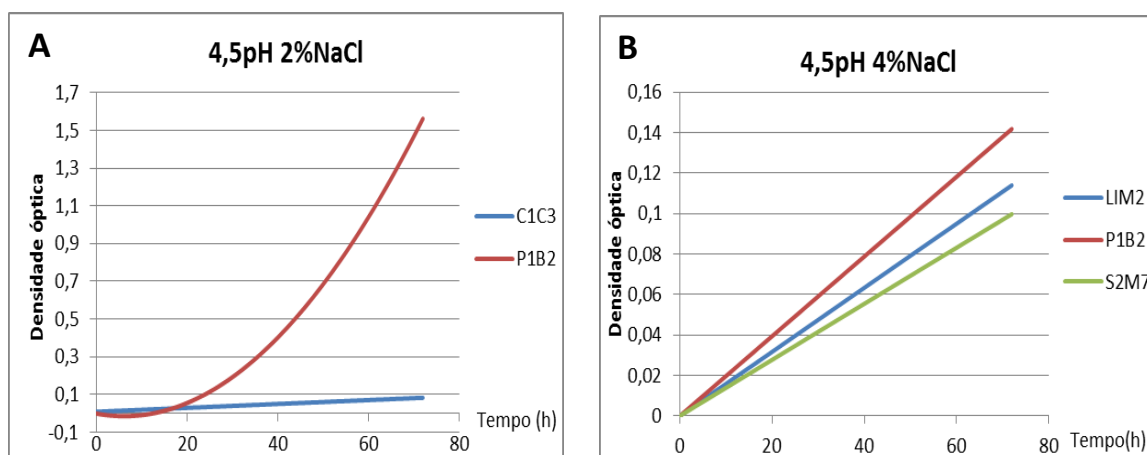


Figura 7: Variação da densidade óptica de culturas de estirpes de *Staphylococcus equorum* à temperatura de 7 °C e pH 5,5 a 2 % (C) de NaCl.

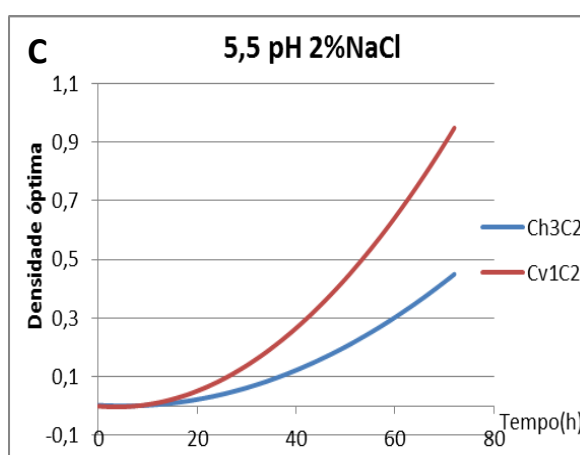
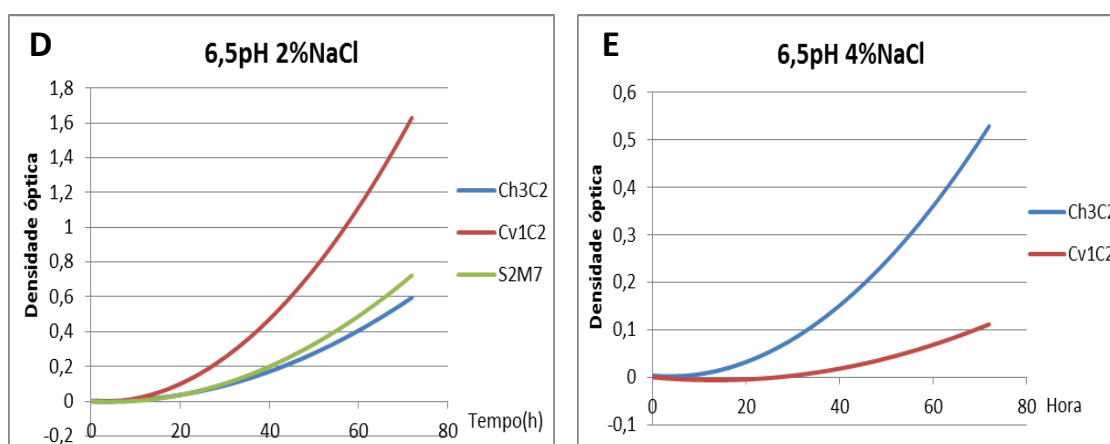


Figura 8: Variação da densidade óptica de culturas de estirpes de *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus equorum* à temperatura de 7 °C e pH 6,5 a 2 % (D) e 4 % (E) de NaCl.



4.3.1.2. Efeito da temperatura a 15 °C

Nas Figuras 9, 10 e 11 estão representados os resultados relativos ao incremento da população das estirpes de *Staphylococcus* estudadas, quando submetidas a temperatura de incubação de 15 °C, pH de 4,5; 5,5 e 6,5 e 2 %, 4 % e 6 % de NaCl, dado pela medição da densidade óptica a 600 nm das respectivas culturas.

Das 9 estirpes de *Staphylococcus* estudadas apenas a S2M7 evidenciou uma multiplicação significativa da população em 2 % de concentração de NaCl e 4,5 de pH, as restantes estirpes não registam aumento da população nestas condições.

Na condição de pH 4,5 e 4 % NaCl as estirpes P1B2 e L1M2 apresentaram comportamento semelhante às evidenciadas para a temperatura de incubação de 7 °C, durante as 72 horas (Figura 9 A).

Tal como os resultados obtidos anteriormente na condição de temperatura 7 °C, pH 4,5 e 6 % NaCl a estirpe L1M2 evidenciou multiplicação significativa durante as 72 horas, quando submetida a temperatura de incubação de 15 °C.

As estirpes S2M7, P1B2 e L1M2 que exibiram multiplicação na condição de pH 4,5 e temperatura de 15 °C pertencem à espécie de *Staphylococcus xylosus*, sendo que, nenhum *Staphylococcus equorum* resistiu a essa condição.

No que refere à condição de pH 5,5, três estirpes de *Staphylococcus equorum* (Ch3C2, Cv1C2 e SG3C5) e um de *Staphylococcus xylosus* (S3M3) apresentaram aumento da população em concentrações de 2 % de NaCl (Figura 10 B).

Somente a estirpe P1B2 se multiplicou na condição de pH 5,5 a 4 % NaCl. Não houve multiplicação de qualquer das estirpes na condição de pH 5,5 a 6 % NaCl.

As estirpes Cv1C2, L1M2, S3M3 e P1B2 apresentaram um comportamento idêntico quando sujeitadas a condição de pH 6,5 e 2 % NaCl (Figura 11 C). A pH 6,5 e 4 % de NaCl apenas a estirpe S2M7 teve um aumento significativo da leitura de densidade óptica a partir das 12 horas de incubação, continuando o seu crescimento ao longo das 72 horas, no entanto as restantes estirpes não evidenciaram multiplicação.

Em concentrações de NaCl de 6 %, pH 6,5 foram as condições às quais as estirpes L1M2, C1C3 e Ch3C2 melhor se adaptaram, apresentando um aumento significativo da população a partir das 6 horas de incubação e durante os 3 dias que se seguiram (Figura 11 D).

Figura 9: Variação da densidade óptica de culturas de estirpes de *Staphylococcus xylosus* à temperatura de 15 °C e pH 4,5 a 4 % (A) de NaCl.

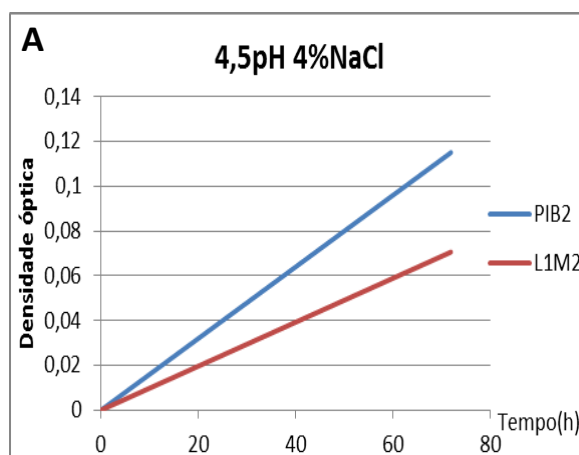


Figura 10: Variação da densidade óptica de culturas de estirpes de *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus equorum* à temperatura de 15 °C e pH 5,5 a 2 % (B) de NaCl.

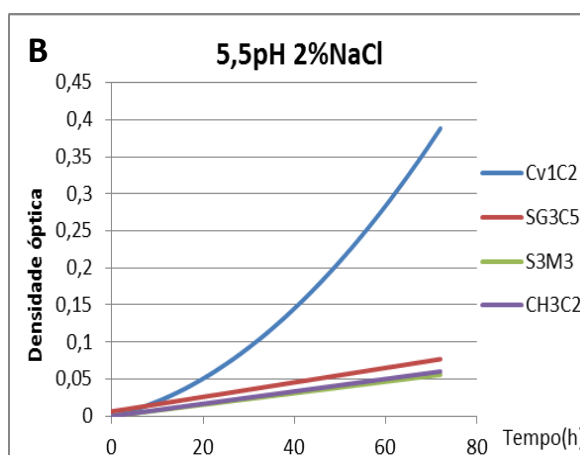
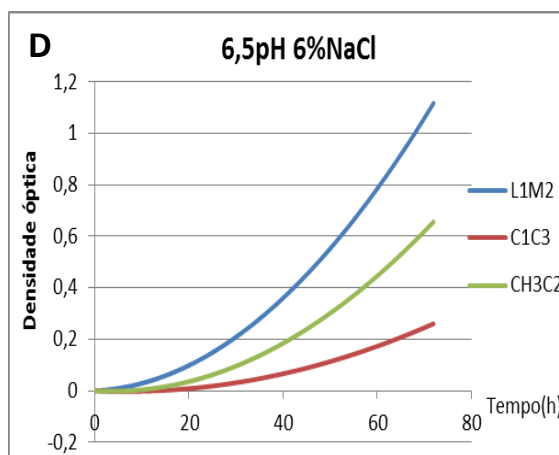
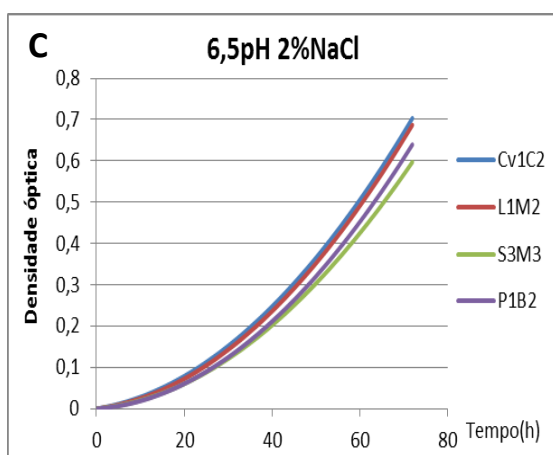


Figura 11: Variação da densidade óptica de culturas de estirpes de *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus equorum* à temperatura de 15 °C e pH 6,5 a 2 % (C) e 6 % (D) de NaCl.



4.3.1.3. Efeito da temperatura a 25 °C

Nas Figuras 12, 13 e 14 estão apresentados a evolução populacional das estirpes de *Staphylococcus* estudadas, medido por densidade ótica de 600 nm, quando submetidas a temperatura de incubação de 25 °C, pH de 4,5; 5,5 e 6,5 e concentração de NaCl de 2 %, 4 % e 6 %.

Na condição de pH 4,5 e 2 % de NaCl as estirpe L1M2, P1B2 e S2M7 (*S. xylosus*) adaptaram-se melhor às condições, sendo que as duas primeiras estirpes evidenciaram multiplicação significativa a partir das 6 horas de incubação até às 72 horas. Porém o isolado S2M7 foi a e que melhor se multiplicou nestas condições (pH 4,5 e 2 % NaCl) (Figura 12 A).

As estirpes S3M3 (*S. xylosus*), P1B6 e SG3C5 (*S. equorum*) mostraram desenvolvimento até às 60 horas de incubação, após o qual se verificou um decréscimo da densidade ótica (Figura 12 A).

Já na condição de pH 4,5 e 4 % de NaCl a estirpe S3M3 evidenciou aumento da população ao longo das 72 horas. As estirpes P1B6, SG3C5 (*S. equorum*), S2M7 e L1M2 (*S. xylosus*) demonstraram ter um acréscimo da população até às 56 horas (Figura 12 B).

Um comportamento semelhante foi evidenciado pelas estirpes L1M2, P1B2, P1B6, S2M7, S3M3 e SG3C5 nas condições de pH 4,5 e 6 % de NaCl (Figura 12 C).

Na condição de pH 5,5 e 2 % NaCl todas as 9 estirpes estudadas apresentaram acréscimo da população. Entretanto somente a estirpe Cv1C2 evidenciou multiplicação e crescimento da população contínuo durante os 3 dias de incubação, as estirpes P1B6 e S3M3 mostraram decréscimo dos valores de densidade ótica após 56 horas. Os isolados L1M2 e P1B2 aumentaram significativamente a população até às 60 horas período após o qual mantiveram-se estáveis até às 72 horas (Figura 13 D).

A estirpe S2M7 multiplicou-se aumentando a população até às 54 horas após o qual também se manteve estável até às 72 horas. A estirpe C1C3 apresentou decréscimo dos valores densidade ótica a partir das 48 horas de incubação (Figura 13 D).

O comportamento das estirpes L1M2 e P1B2 na condição de pH 5,5 e 4 % NaCl foi idêntico durante as 72 horas de incubação. As estirpes P1B6 e S3M3 também apresentaram comportamento semelhante nesta condição, mas a partir das 60 horas de incubação houve decréscimo dos valores da densidade ótica (Figura 13 E).

O isolado S2M7 apresentou um aumento contínuo da população durante os 3 dias de incubação ao contrário do que aconteceu na condição pH 5,5 e 2 % de NaCl onde a estirpe S2M7 manteve-se estável (Figura 13 E).

A 6 % NaCl e pH 5,5 as estirpes L1M2 e S2M7 apresentaram um acréscimo contínuo da população ao longo dos 3 dias de incubação. O isolado S3M3 demonstrou decréscimo dos valores da densidade óptica a partir das 56 horas enquanto a SG3C5 começou a decrescer após 64 horas de incubação (Figura 13 F).

As estirpes Ch3C2 e Cv1C2 (*S. equorum*) foram as únicas que não tiveram um aumento da população nas condições de pH 5,5 em 4 % e 6 % de NaCl.

De notar que a estirpe C1C3 exibiu o mesmo comportamento em todas as condições de NaCl quando o pH do meio era 5,5, decrescendo os valores de densidade óptica após às 48 horas de incubação (Figura 13 D, E e F).

A Figura 14 referentes à condição de pH de 6,5 e à temperatura de incubação de 25 °C mostram que as nove estirpes selecionadas para o estudo se multiplicam com aumento significativo da sua população nas diferentes concentrações de NaCl.

A C1C3 (*S. xylosus*) foi a estirpe que apresentou maior acréscimo dos valores de densidade óptica em todas as concentrações de NaCl, sendo a densidade óptica mais elevada na concentração de 6 % de NaCl.

As estirpes Ch3C2 e Cv1C2 (*S. equorum*) apresentaram acréscimo populacional semelhante em todas as concentrações de NaCl e o decréscimo dos valores de densidade óptica variou a partir das 52 a 56 horas.

Em concentrações de NaCl de 2 % as estirpes P1B2, L1M2, S3M3 e P1B6 demonstraram multiplicação e aumento populacional até aproximadamente 52 horas (Figura 14 G). Comportamento idêntico foi também evidenciado pelas estirpes L1M2, S3M3 em concentração de 4 % e 6 % e pela estirpe SG3C5 em concentrações de 2 %, 4 % e 6 % NaCl.

A estirpe P1B2 demonstrou acréscimo significativo da sua população até às 56 horas nas condições de pH 6,5, 2 % e 4 % NaCl, após esse período manteve-se estável até as 72 horas (Figura 14 G e H). A estirpe S2M7 desenvolveu-se em todas as concentrações de NaCl quando o valor de pH era 6,5 (Figura 14).

Figura 12: Variação da densidade óptica de culturas de estipes de *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus equorum* à temperatura de 25 °C e pH 4,5 a 2 % (A), 4 % (B) e 6 % (C) de NaCl.

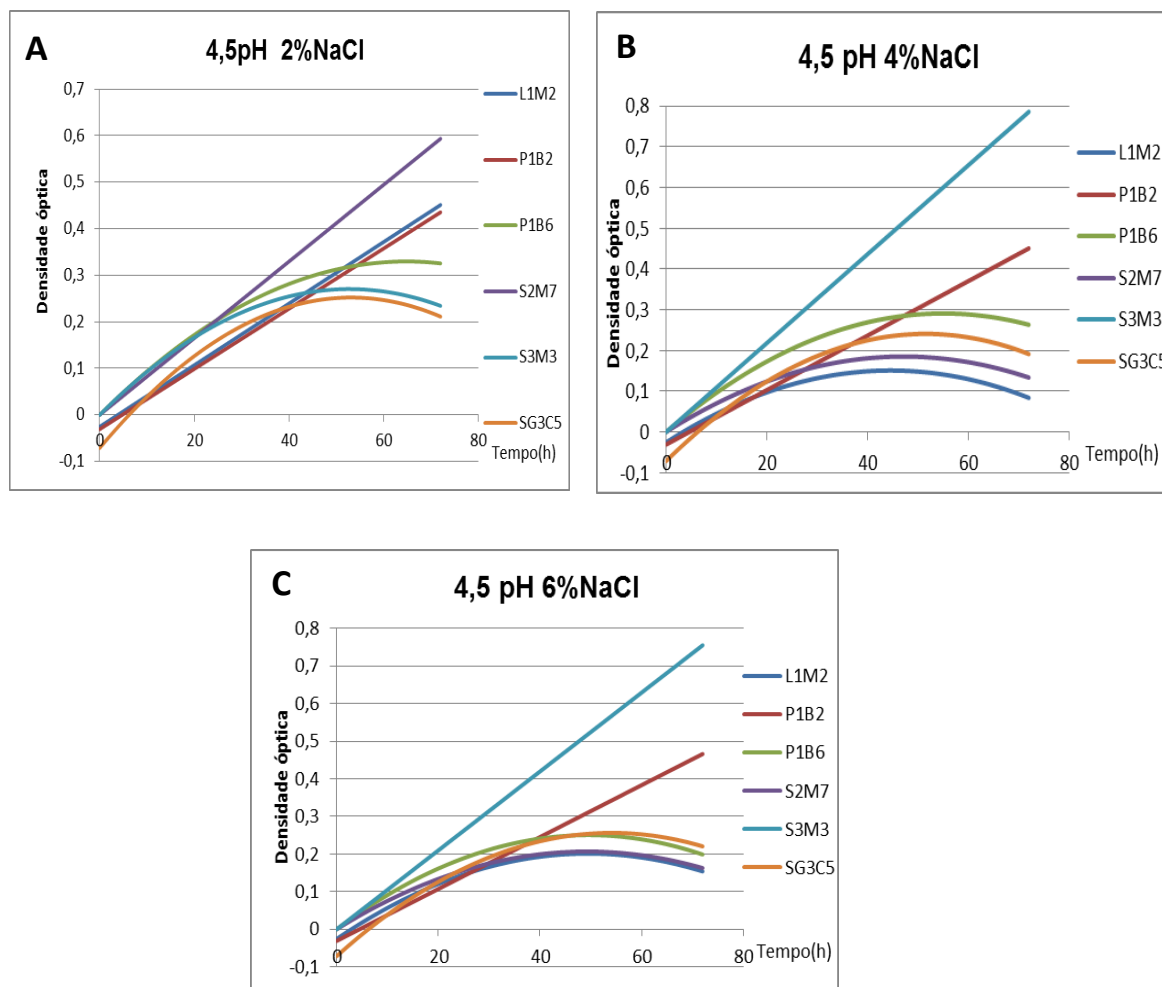


Figura 13: Variação da densidade óptica de culturas de estipes de *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus equorum* à temperatura de 25 °C e pH 5,5 a 2 % (D), 4 % (E) e 6 % (F) de NaCl.

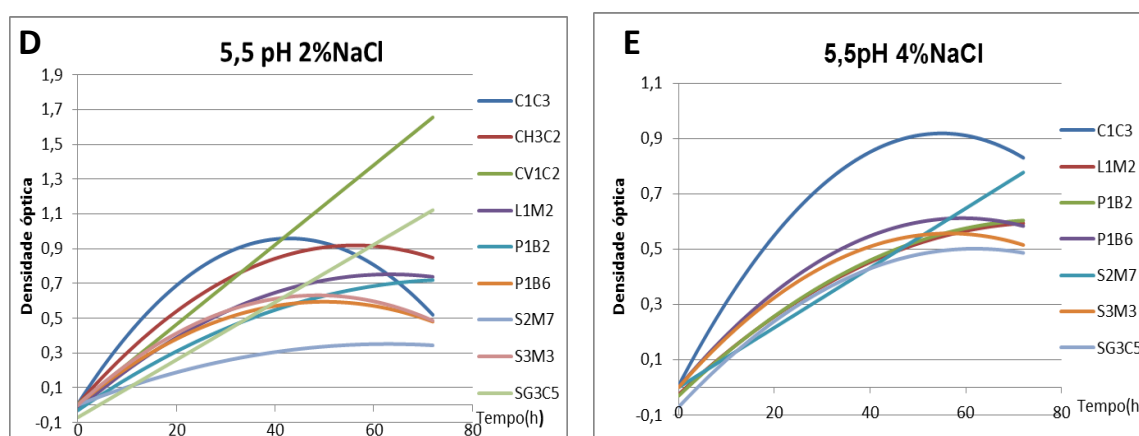


Figura 13: (continuação) Variação da densidade óptica de culturas de estipes de *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus equorum* à temperatura de 25 °C e pH 5,5 a 2 % (D), 4 % (E) e 6 % (F) de NaCl.

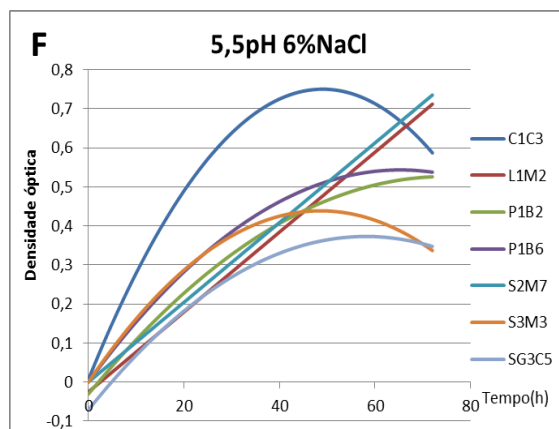
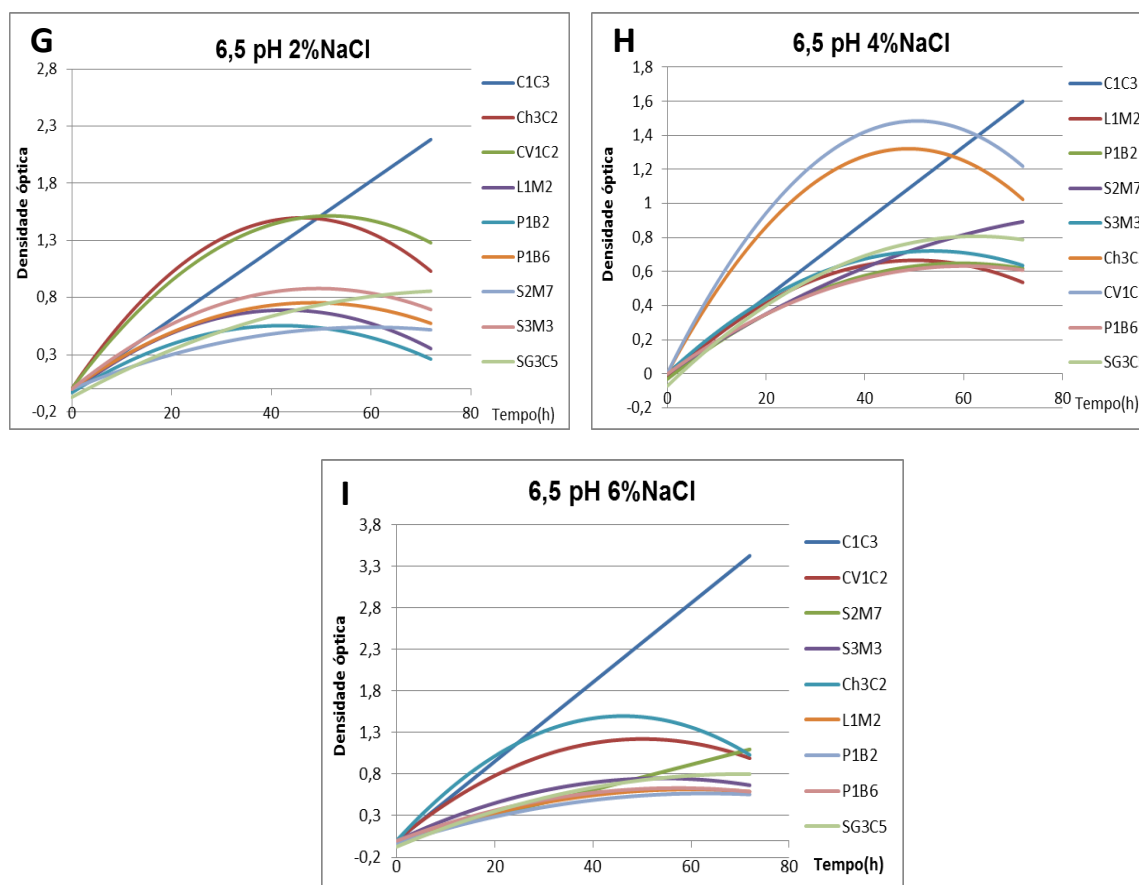


Figura 14: Variação da densidade óptica de culturas de estipes de *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus equorum* à temperatura de 25 °C e pH 6,5 a 2 % (G), 4 % (H) e 6 % (I) de NaCl.



5. DISCUSSÃO

Da coleção de estirpes de *Estafilococos* Coagulases Negativa estudadas, 18 pertenciam à espécie *Staphylococcus equorum* e 43 à espécie de *Staphylococcus xylosus*, provenientes de quatro Unidades Fabris (A, B, C e D), de uma diversidade de produtos cárneos fermentados, colhidas em diferentes fases de produção e superfícies do ambiente fabril.

Todas as estirpes em estudo foram submetidas a avaliação genotípica e fenotípica (testes de sensibilidade a antibióticos) antes da sua seleção para a determinação do efeito da temperatura, NaCl e pH.

A aplicação de PCR *fingerprinting* permitiu-nos excluir estirpes consideradas idênticas, selecionando aquelas com perfis genéticos diferente, de acordo com a origem da amostra (os isolados pertencentes ao mesmo grupo, que apresentaram 90 a 100 % de semelhança foram considerados clones). De referir ainda que, dos dendogramas obtidos, somente algumas estirpes mostraram relação entre o perfil genético e a unidade fabril onde foram provenientes demonstrando-se uma enorme diversidade entre as espécies (Carvalho, 2010).

Os SCN usadas como cultura de arranque na indústria alimentar devem ser seguros do ponto de vista microbiológico e toxicológico. Deste modo a sua utilização tem sido questionada por vários autores, devido a possibilidade de transportar genes de resistência a antibióticos (Cocconcelli, 2007), de produzir enterotoxinas (Zell *et al.*, 2008) e aminas biogénicas (Vidal-Carou *et al.*, 2007).

Dada a importância da segurança das estirpes de SCN isolados nos produtos cárneos fermentados e sua futura utilização com cultura de arranque, a ausência de resistência a antibióticos foi um critério relevante na escolha destes microrganismos, sendo selecionadas estirpes sensíveis e em alguns casos com resistência a apenas um antibiótico.

Nos testes de sensibilidade a antibióticos, as estirpes de *S. equorum* estudadas mostraram sensibilidade a vancomicina, gentamicina, daltopristina/quinupristina e rifampicina, apresentando resistência à penicilina (22 %), tetraciclina (11 %), eritromicina (17 %), lincomicina (22 %) e cloranfenicol (11 %).

Tal como os resultados do presente estudo, Marty *et al.*, (2012) também relataram sensibilidade à vancomicina, gentamicina, cloranfenicol e rifampicina.

Estudos efetuados por diversos autores (Resch *et al.*, 2008; Marty *et al.*, 2012) revelam que os SCN isolados nos produtos cárneos fermentados são frequentemente resistentes a eritromicina, penicilina, lincomicina e tetraciclina.

Num total de 64 isolados de *Staphylococcus equorum* testados por Resch *et al.*, (2008) todos mostraram sensibilidade à vancomicina e gentamicina. Contudo descreveram isolados resistentes à lincomicina (48 %), igualmente, ainda que baixa, à penicilina (6 %), tetraciclina (6 %), eritromicina (14 %) e rifampicina (3 %).

A frequência baixa de resistência à tetraciclina (6 %) e eritromicina (6 %) num total de 17 isolados de *Staphylococcus equorum* estudados foram também relatados por Marty *et al.*, (2012). De acordo com Even *et al.*, (2010), 26 % dos *Staphylococcus equorum* (n=31) isolados de enchidos fermentados e queijos apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico.

Dos 43 isolados de *Staphylococcus xylosus* analisados no presente trabalho, 91 % mostraram resistência a tetraciclina e 42 % a penicilina. No entanto todos (100 %) exibiram sensibilidade a vancomicina, eritromicina, gentamicina, daltopristina/quinupristina, rifampicina, lincomicina e cloranfenicol.

Segundo diversos autores *Staphylococcus xylosus* isolados dos produtos cárneos fermentados são frequentemente resistentes à eritromicina, penicilina e tetraciclina (Marty *et al.*, 2012). Também Resch *et al.*, (2008) num total de 137 isolados de *Staphylococcus xylosus*, 69 % foram resistentes à penicilina, 53 % à lincomicina, 36 % à tetraciclina e 1 % à eritromicina. Even *et al.*, (2010) relataram que 32 % e 17 % dos isolados em estudo foram resistentes à penicilina e tetraciclina, respetivamente.

Marty *et al.*, (2012) verificaram na sua pesquisa que dos *Staphylococcus xylosus* (n=63) estudados, 57 % apresentaram resistência aos antibióticos, sendo sensíveis à vancomicina, gentamicina, cloranfenicol e rifampicina.

Podemos concluir que a resistência apresentada pelos isolados no presente estudo à tetraciclina é muito mais elevada do que a relatada pelos diferentes autores.

A elevada percentagem de resistência dos isolados à tetraciclina (91 %) e em menor escala à penicilina (42 %) podem ser explicadas pela larga utilização destes fármacos na terapêutica e prevenção de doenças animais. Sorum e Sunde (2001) consideram que o sobrepopulação, idade, stress ambiental e manejo dos animais também são fatores que podem estar implicados no aparecimento e disseminação de microrganismos resistentes.

A incidência de multi-resistência dos isolados de *Staphylococcus xylosus* em produtos cárneos fermentados foi relatada por Simeoni *et al.*, 2008. No presente estudo alguns isolados de *S. xylosus* provenientes da unidade fabril A (n=28) apresentaram resistência a 2 antibióticos. Os *Staphylococcus equorum* provenientes da Unidade Fabril C demostram resistência de até 4 antibióticos.

Após a escolha dos isolados, com base nos resultados dos testes de sensibilidade a antibióticos e do perfil genético, as estirpes foram submetidas a provas seletivas por

forma a encontrar algumas com características que permitem a sua utilização como *starters* nos produtos cárneos fermentados. Assim, foi testada a capacidade das estirpes Ch3C2, Cv1C2, P1B6 e SG3C5 (*Staphylococcus equorum*) e as estirpes C1C3, L1M2, P1B2, S2M7 e S3M3 (*Staphylococcus xylosus*) de crescerem em diferentes condições de temperatura (7 °C, 15 °C e 25 °C), concentração de cloreto de sódio (2 %, 4 % e 6 %) e valores de pH (4,5; 5,5 e 6,5).

A capacidade de multiplicação dos *Staphylococcus* em temperaturas baixas está incluída nos requisitos a que as estirpes devem cumprir quando se pretende aplica-las como *starters*. Entretanto a grande maioria dos enchidos tradicionais portugueses, as massas da carne são sujeitas a um período de maturação de 24 a 48 hora, entre 4 °C e 6 °C, e por vezes são introduzidas em fumeiros onde as temperaturas máximas rondarão os 30 a 35 °C (Elias, 2004). Mauriello *et al.*, 2004 refere que a fermentação dos produtos cárneos fermentados pode ser realizada a temperatura de 18 a 24 °C entre 1 a 2 dias ou a temperatura baixa durante uma semana.

Por estes motivos, as provas de capacidade de crescimento em diferentes temperaturas não podem ser eliminadas do processo de seleção.

O pH do meio deve ser tido em consideração, uma vez que interfere com a sobrevivência e atividade das estirpes usadas como *starters* nos produtos cárneos fermentados. A tolerância dos isolados em meios ácidos também é necessária para prevenir o desenvolvimento de agentes patogénicos durante a produção dos produtos (García-Varona *et al.*, 2000; Bonomo *et al.*, 2009).

A capacidade de crescimento em diferentes concentrações de cloreto de sódio é outra característica que devem possuir as estirpes que se pretende utilizar como *starters*. Entretanto por questões de saúde ou mesmo por exigências relacionadas com as preferências dos consumidores a concentração de NaCl utilizada nos enchidos fermentados não deve ultrapassar os 3 %.

Os resultados do presente estudo mostram que os isolados que adaptam-se melhor à temperatura de 7 °C e pH 4,5 foram todas pertencentes a espécie de *S. xylosus* (C1C3, P1B2, L1M2 e S2M7), colhidas da massa inicial (com a exceção da S2M7 da superfície) e de uma variedade de enchidos.

Ao contrário das estirpes de *Staphylococcus equorum*, Ch3C2 isolada do produto acabado e Cv1C2 colhida da massa inicial evidenciaram multiplicação e incremento da população à temperatura de 7 °C mas somente em valores de pH de 5,5 e 2 % de NaCl. As mesmas estirpes mostraram aumento da população em meio com 6,5 pH. De referir ainda que apenas a estirpe S2M7 se desenvolveu em pH de 6,5 e concentrações de 2 % de NaCl.

Na temperatura de 7 °C as estirpes evidenciaram uma taxa de multiplicação, ainda que baixa, ao longo dos 3 dias de incubação. Resultados obtidos por Hammes e Hertel (1998) demonstram que as estirpes de *Staphylococcus equorum* usadas como *starters* nos produtos cárneos cresciam a temperaturas inferiores a 10 °C contudo, Bonomo *et al.*, (2009) relataram que os *Staphylococcus* não se multiplicam bem a temperaturas de 10 °C.

Em relação a temperatura de incubação de 15 °C e pH 4,5, independentemente da concentração de NaCl, apenas cresceram espécies de *S. xylosus* (S2M7, P1B2 e L1M2). À temperatura de 15 °C e pH de 5,5 as estirpes de *Staphylococcus equorum*, oriundas da unidade fabril C, colhidas do produto acabado (Ch3C2 e SG3C5) e massa inicial (Cv1C2) foram as que apresentaram melhor potencial nessas condições.

Resultados obtidos por Carvalho (2010) demonstram que alguns isolados de *S. xylosus* diminuíram os valores de densidade ótica da cultura quando submetidos à temperatura de 15 °C e pH de 5,5 entre as 24 e 48 horas de incubação.

Pode-se concluir que à temperatura de 7 °C e 15 °C as estirpes L1M2 e P1B2 (*S. xylosus*) adaptaram-se melhor ao meio de pH 4,5 e as estirpes Ch3C2 e Cv1C2 (*S. equorum*) adaptaram-se melhor ao meio de pH 5,5. Tais estirpes podem ser selecionadas para futura utilização como *starters* nos produtos cárneos fermentados, pois apresentaram tolerância ao meio ácido e multiplicação à temperatura a que ocorre durante o processo fabril.

Na temperatura de incubação de 25 °C a maioria das estirpes resistiram a todas as condições de pH e concentrações de NaCl estudadas.

No que refere a pH de 4,5 a estirpe S2M7 (*S. xylosus*) foi a que apresentou melhor desenvolvimento ao longo das 72 horas e as estirpes P1B6 e SG3C5 (*S. equorum*) só multiplicaram até às 60 horas.

As estirpes S3M3 e P1B2 evidenciaram um aumento contínuo da população durante os 3 dias de incubação, quando submetidas a condições de pH de 4,5 e 4 % e 6 % NaCl.

Ao contrário do que se verificou nos resultados exibidos à temperatura de incubação de 7 °C e 15 °C, as estirpes Cv1C2 e Ch3C2 (*S. equorum*) não resistiram às condições de pH 5,5 em 4 % e 6 % NaCl à temperatura de 25 °C.

A estirpe C1C3 procedente da unidade fabril C, colhida da massa inicial exibiu um comportamento idêntico em todas as condições de NaCl quando o pH do meio era 5,5 e temperatura de incubação de 25 °C.

Nas condições de pH 6,5 e à temperatura de incubação de 25 °C as nove estirpes selecionadas para o estudo tiveram capacidade de se multiplicar, aumentando significativamente a sua população nas diferentes concentrações de NaCl.

Estudos realizados por Essid *et al.*, (2007) relataram que os *S.xylosus* apresentam um ótimo crescimento a 30 °C, pH 5,5 e 20 % NaCl, embora, se tenham desenvolvido também à temperatura de 10 °C e 20 °C, na presença de 10 e 15 % NaCl e pH 4 e 5. Outros resultados obtidos por Mauriello *et al.*, (2004) e Casaburi *et al.*, (2005) demonstraram que os *Staphylococcus carnosus* e *Staphylococcus simulans* (estirpes que não foram alvos do presente estudo) crescem à temperatura de 15 °C e 20 °C, na presença de 10 %, 15 % e 20 % de NaCl, bem como em valores de pH de 5,0 e 5,5. Visto que na temperatura de incubação de 25 °C a maioria das estirpes resistem a todas os valores de pH e concentrações de NaCl estudadas, pode-se concluir que quanto maior a temperatura até ao seu limite ótimo de crescimento, maior é a capacidade das estirpes de *Staphylococcus* se desenvolverem. Deste modo, tanto os *Staphylococcus xylosus* como os *Staphylococcus equorum* selecionados, são considerados aptos para serem utilizadas como culturas *starters* em produtos cárneos fermentados com possibilidade de resistirem e de se adaptarem às variações de pH e temperatura que ocorrem durante o processo tecnológico.

6. CONCLUSÃO

O objetivo principal do trabalho foi selecionar, a partir de uma coleção de 61 isolados, as estirpes com perfis genéticos diferentes e com características de segurança apropriadas, especialmente a ausência de resistências a antibióticos. Por fim, pretendeu-se avaliar a capacidade de alguns desses elementos para crescerem em diferentes condições de temperatura, cloreto de sódio e pH.

A frequência de isolados resistentes aos antibióticos da unidade fabril A levanta questões relativamente ao seu uso como futuras culturas de arranque.

As provas de capacidade de multiplicação a diferentes temperaturas, pH e NaCl não podem ser eliminadas do processo de seleção, pelo que também estão incluídas nos requisitos a que as estirpes devem cumprir quando se pretende aplicá-las como *starters*. O desenvolvimento dessas estirpes a diferentes temperaturas mostra a sua aptidão em se adaptar ao meio e às condições de fermentação a que os produtos cárneos fermentados são submetidos.

Conclui-se assim que, as estirpes *Staphylococcus xylosus* L1M2 (proveniente da unidade fabril B, colhida da massa inicial da linguiça), S2M7 (proveniente da unidade fabril B, colhida da picadora) e P1B2 (proveniente da Unidade fabril A, colhida da massa inicial do paio), assim como as estirpes *Staphylococcus equorum* Ch3C2 e Cv1C2 (ambas provenientes da unidade fabril C) pelas suas capacidades de multiplicação e adaptação, demonstraram, possuir potencial para serem utilizadas em culturas de arranque. No entanto, há necessidade de realizar mais estudos relativos aos aspetos de segurança para sua classificação como QPS (*Qualified presumption of safety*) ou GRAS (*Generally Recognized as Safe*).

7. BIBLIOGRAFIA

- Ammor, M.S., Flórez, A.B., & Mayo, B. (2007). Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*, 24, 559-570.
- Andrés, A., Barat, J.M., Grau, R., Fito, P. (2007). Principles of drying and smoking. In Toldrá, F. (Eds). *Handbook of fermented meat and poultry*. Ed. Blackwell Publishing Professional. Oxford,UK; 37-50.
- Barreto, A. (2012). Introdução ao estudo das carnes VII. Apontamentos de apoio às aulas teóricas de Tecnologia de produtos animais. FMV, UTL, Lisboa, Portugal; pp-38.
- Barrière, D. Centeno, A. Lebert, S. Leroy-Setrin, J. Berdagué, R. Talon (2001). Roles of superoxide dismutase and catalase of *Staphylococcus xylosus* in the inhibition of linoleic acid oxidation. *FEMS Microbiology letters*, 201, 181-185.
- Blaiotta, G., Ercolini, D., Pennacchia, C., Fusco, V., Casaburi, A., Pepe, O., Villani, F. (2004). PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and sel in *S. aureus* AB-8802. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 719-730.
- Blaiotta, G., Pennacchia, C., Villani, F., Ricciardi, A., Tofalo, R., Parente, E. (2004). Diversity and Dynamics of communities of coagulase-negative staphylococci in traditional fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 271-284.
- Bonomo, M.G., Ricciardi, A., Zotta, T., Sico, M.A. & Saltzaro, G. (2009). Technological and safety characterization of coagulase-negative staphylococci from traditionally fermented sausage of Basilicata region (Southern Italy). *Meat Science*, 83, 15-23.
- Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M. & Vidal-Carou, M. C. (2001). Effect of the interaction between a low tyramine-producing *Lactobacillus* and proteolytic *Staphylococci* on biogenic amine production during ripening and storage of dry sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 65, 113-123.
- Caplice, E., Fitzgerald, G.F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 15, 131-149.
- Carvalho, L. (2010). Identificação e caracterização de isolados de *Staphylococcus*: sua utilização como culturas de arranque em enchidos fermentados secos e fumados. Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar. FMV, UTL, Lisboa, Portugal; pp-100.
- Casaburi, A., Aristoy, M-Conception., Cavella, S., Di Monaco, R., Ercolini, D., Toldrá F. & Villani, F. (2007). Biochemical and sensory characteristics of traditional fermented sausages of Vallo di Diano (Southern Italy) as affected by the use of starter cultures", *Meat Science*, 76, 295-307.
- Casaburi, A., Blaiotta, G., Mauriello, G., Olimpia, P. & Villani, F. (2005). Technological activities of *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus simulans* strains isolated from fermented sausages. *Meat Science*. 71, 643 – 650.
- CLSI, (2008). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. Approved Standard Third Edition, CLSI document M31-A3. Wayne, Pennsylvania, USA; pp-116.

- Cocconcelli, P.S. (2007). Starter cultures: bacteria. In Toldrá F. (Eds), *Handbook of fermented meat and poultry*, Ed. Blackwell Publishing Professional. Oxford, UK; 137-145.
- De Vos, P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A. and Schleifer K. & Whitman W. (2009). *Bergey manual of Systematic Bacteriology: The Firmicutes* (2nd ed.). New York: Springer.
- Decreto-lei 33/2008 de 25 de Fevereiro. Diário da República nº39/08-I Série. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa
- Decreto-lei 207/2008 de 23 de Outubro. Diário da República nº206-I Série. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa, Portugal
- Drosinos, E.H., Mataragas, M., Xiraphi, N., Moschonas, G., Gaitis, F., Metaxopoulos, J. (2005). Characterization of the microbial flora from a traditional greek fermented sausage, *Meat Science*. 69, 307- 317.
- Drosinos, E.H., Paramithiotis, S., Kolovos, G., Tsikouras, I., Metaxopoulos, I. (2007). Phenotypic and technological diversity of lactic acid bacteria and staphylococci isolated from traditionally fermented sausages in Southern Greece. *Food Microbiology*. 24, 260-270.
- EFSA (2011). European Food Safety Authority. Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal* 9, 10: 2393.
- Elias, M. (2004). Caracterização, conservação e produção Biotecnológica de paio de porco alentejano. Dissertação para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Alimentar. Évora
- Elias, M., Fraqueza, M.J., Barreto, A. (2006). Caracterização do processo de fabrico do chouriço tradicional alentejano, *Revista Portuguesa de Zootecnia*, 13, 1- 10.
- Elias, M., Santos, A. C., Raposo, B. (2007). Caracterização das matérias-primas subsidiárias usadas no fabrico de paio de porco alentejano, *Revista de Ciências Agrárias*, vol. 30, 424-438.
- EUCAST (2013). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.0. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST. <http://www.eucast.org>.
- Euzeby, J.P. (2013). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Genus *Staphylococcus*. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>.
- Even, S., Leroy, S., Charlier, C., Ben Zakour, N., Chacornac, P., Lebert, I. (2010). Low occurrence of safety hazards in coagulase negative staphylococci isolated from fermented foodstuffs. *International Journal of Food Microbiology*, 139, 87-95.
- Fernández, J.M.B. (2000). Utilización de mohos y sus extractos enzimáticos intracelulares para potenciar la generación de sustancias aromáticas y sápidas en embutidos curados. Dissertação para obtenção do grau de Doutor em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Universidade Complutense de Madrid. Madrid, Espanha.
- Flores, J. (1977). Parametros de calidad utilizados para la normalización o tipificación de los productos cárnicos. *Revista Agrop Tecnologia Alimentar*, 17, 444-450.

- Flores, J. (1997). Mediterranean vs Northern European meat products. Processing Technologies and main differences. *Food Chemistry*, 9, 505-510.
- Flores, M., Marina, M., Toldra, F. 2000. Purification and characterization of soluble methionyl aminopeptidase from porcine skeletal muscle. *Meat Science*, 56, 247-54
- Fornias, V., F., Diaz, C. V. (1999). Classificacion de los productos cárnicos, *Revista Cubana Aliment Nutri*, 13,63-7.
- Fraqueza, M. J. (2012). Tecnologia de produtos cárneos: Ingredientes. Texto de apoio às aulas práticas de Tecnologia de produtos animais.FMV, UTL, Lisboa, Portugal; pp-12.
- Garcia, I., Zumalacárregui, J. M., Diez, V. (1995). Microbial sucession and identification of *Micrococcaceae* in dried beef cecina, an intermediate moisture meat product . *Food Microbiology*. 12, 309-315
- Garcia-Varona, M., Santos, E. M., Jaime, I., Rovira, J. (2000). Characterisation of *Micrococcaceae* isolated from different varieties of Chorizo. *International Journal of food microbiology*,. 54, 89-195.
- Gardini, F., Martuscelli, M., Crudele, M.A., Paparella, A., Suzzi, G. (2002). Use of *Staphylococcus xylosus* as a starter culture in dried sausages: effect on the biogenic amine content. *Meat science*. 61, 275-283.
- Garriga, M. & Aymerich, T. (2007). The Microbiology of Fermentation and Ripening. In Toldra F. (Eds), *Handbook of fermented meat and poultry*, Ed. Blackwell Publishing Professional. Oxford, UK;113-124
- Gutiérrez L.M., Garcíá M.L. & Otero M.C. (1990). Incidence of staphylococci in ovine mastitic milk and antibiotic susceptibility of the strains. *Milchwissenschaft*, 45, 778-781.
- Gøtterup, J., Olsen, K., Knöchel, S., Tjener, K., Stahnke, L., H. & Møller, J. K. S. (2007). Relationship between nitrate/nitrite reductase activities in meat associated staphylococci and nitrosylmyoglobin formation in a cured meat model system. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 303-310.
- Guerreiro, M. (2011). Estudo da microbiota de um produto cárneo cozido. Aplicação de Duas Tecnologias de Embalagem: Vácuo e Atmosfera Modificada. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar. Lisboa: ISA – UTL. Lisboa, Portugal; pp- 61.
- Hajek, V., Meugnier, H., Bes, M., Brun, Y., Fieldler, F., Chmela, Z., Lasne, Y., Fleurette, J. & Freney, J. (1996). *Staphylococcus saprophyticus* subsp.*bovis* subsp. nov.isolated from bovine Nostrils. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46, 792-796.
- Hammes, W. P. & Hertel, C. (1998). New Developments in meat starter cultures. *Meat Science*. 49, 25-38
- Hammes, W.P., Bantleon, A. & Min, S. (1990). Lactic acid bacteria in meat fermentation. *FEMS Microbiology Rev.*, 87, 165-174.
- Hammes, W. (2012). Metabolism of nitrate in fermented meats: The characteristic feature of a specific group of fermented foods. *Food Microbiology*, 29, 151-156.

Hansen, E.B. (2002). Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future, *International Journal of food microbiology*, 78, 119-131.

Honikel, K. (2008) – The use and control of nitrate and nitrite for processing of meat products. *Meat Science*. 78, 68-76.

Hugas, M., Monfort, J. M.(1997). Bacterial Starter Cultures for meat fermentation, *Food Chemistry*, 59, 547-554.

Kloos, W. E., Schleifer, K. H. (1975). Isolation and characterization of staphylococci from human skin. Descriptions of four new species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis* and *Staphylococcus simulans*. *International Journal of Systematic and Bacteriology* 25, 62-79

Kloos, W. E., Schleifer, K. H. (1986). Gram positive cocci: Family I. *Micrococcaceae*. Genus IV. *Staphylococcus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, ed. Sneath, P. H., Mair, N. S., Sharpe, M. E., and Holt, J. G., Vol. 2, pp. 1013-35. Baltimore: Williams & Wilkins.

Lebert, I., Leroy, S. & Talon, R.(2007). Microorganisms in tradicional fermented meats. In Toldra F. (Eds), *Handbook of fermented meat and poultry*. Ed. Blackwell Publishing Professional. Oxford, UK, 113-124.

Leroy, F. & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry, *Food Science & Technology*. 15, 67-78.

Leroy, F., Verluyten, J., De Vuyst, L. (2006). Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation, *International Journal of Food Microbiology*, 106, 270-285.

Lucke, F.K., (1998). Fermented sausages. In Wood, B, J.B, *Microbiology of fermented foods* (2th ed, pp.441-472). Reino Unido: Elsevier Applied Science Publishers.

Lucke, F.K., (2000). Fermented Meat. In Lund, B.M., Baird-Parker, T.C., Gould, G.W. Microbiological safety and quality of foods. E.U.A: An Aspen Publishers, 420-444.

Mauriello, G., Casaburi, A., Blaiotta, G., & Vilanni, F. (2004). Isolation and technological properties of coagulase negative *staphylococci* from fermented sausages of Southern Italy, *Meat Science*, 67, 149-158

Marco, A., Navarro, J. L. & Flores, M. (2006). The influence of nitrite and nitrate on microbial, chemical and sensory parameters of slow dry fermented sausage. *Meat Science*. 73, 660-673.

Martin, B., Garriga, M., Hugas, M., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M. T. & Aymerich, T. (2006). Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase positive cocci from slightly fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 107, 148-158.

Martín, A., Colin, B., Aranda, E., Benito, M.J., Córdoba, M.G. (2007). Characterization of *Micrococcaceae* isolated from Iberian dry-cured sausage. *Meat Science*, 75, 696-708.

Marty, E., Bodenmann, C., Buchs, J., Hadorn, R., Eugster-Meier, E., Lacroix, C., Meile, L. (2012). Prevalence of antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococci from

spontaneously fermented meat products and safety assessment for new starters. *International Journal of Food Microbiology*, 159, 74-83.

Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e Pescas (2001). Produtos tradicionais com nomes protegidos. Lisboa: MADRP.

MØller, J.S., Skibsted, L.H. (2002). Nitric Oxide and myoglobins. *Chem.Rev.* 102, 1167-1178.

Moretti, V.A., Madonia, G., Diaferia, C., Mentasti, T., Paleari, M.A., Panseri, S., Pirone, G., Gandini, G. (2004). Chemical and microbiological parameters and sensory attributes of a typical sicilian ripened in different conditions. *Meat Science*. 66, 845-854.

Morot-Bizot S.C., Leroy, S., & Talon, R. (2006). Staphylococcal community of a small unit manufacturing traditional dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 210-217.

Moss, G. P. 2000. *Peptidase Nomenclature. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) Enzyme Nomenclature. Recommendations.* disponível em: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/EC34/>.

Motarjemi, Y. (2002). Impact of a small scale fermentation technology on food safety in developing countries. *International Journal of Food Microbiology*, 75, 213-229.

Munoz, B., Salas, E., Corneiles, E. (1991). Diferentes técnicas de fermentacion en la elaboracion de productos carnicos fermentados. *Revista científica*, FCV de Luz, 2 nº1. Universidad del Zulia, Maracaibo. Venezuela.

Neves, T. (2012). Caracterização e avaliação da capacidade produtora de biofilmes em Estafilococos Coagulase Negativa isolados de superfícies do ambiente fabril: Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar. Lisboa: FMV – UTL.

Ordoñez, J.A., Hoz, L. (2007). Mediterranean Products. In Toldrá, F. *Handbook of fermented meat and poultry*. Ed. Blackwell Publishing Professional. Oxford, UK, 333-347.

Patarata, L., Cardoso, P., Bessa, C., Silva, J. A., Martins, C., (1998). The role of phosphates on sensory attributes of a traditional dry-cured sausage - linguiça. *44th International Congress of Meat Science and Technology*, Barcelona. II: 848-849.

Patarata, L., Esteves, A., Martins, C. (1998). Contribuição para a aplicação de métodos de garantia de qualidade ao fabrico de linguiça de Vinha d'Alhos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* XCIII: 162-66.

Place, R.B., Hiestand, D., Gallmann, H.R. & Teuber, M. (2003). *Staphylococcus equorum* subespecie *linens*, subespecie nov., a starter culture for surface ripened semi-hard cheeses. *System Applied Microbiology*, 26, 30-37.

Price, J.F., Schweigert, B.S. (1994). Ciência de la carne y de los productos cárnicos. Zaragoza: Acribia, pp.581.

Podkowik, M., Park, J.Y., Seo, K.S., Bystrón, J. Bania, J. (2013). Enterotoxigenic potential of coagulase negative staphylococci. *International Journal of Food Microbiology*, 163, 34-40.

Regulamento (CE) n.º 853/2004 de 29 de Abril, que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal.

Regulamento (CE) n.º 509/2006 do Conselho, de 20 de Março, relativo às especialidades tradicionais garantidas dos produtos agrícolas e dos géneros alimentícios, uma protecção especial aos produtores de “especialidades regionais.

Regulamento (CE) n.º 510/2006 de 20 de Março, relativo à protecção das indicações geográficas e denominações de origem dos produtos agrícolas e dos géneros alimentícios.

Resch, M., Nagel, V., Hertel, C. (2008). Antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci associated with food and used in starter cultures. *International journal of food microbiology*, 127, 99-104.

Roncalés, P. (2007) Additives. In Toldrá, F. (Eds), *Handbook of fermented meat and poultry*. Ed. Blackwell Publishing Professional. Oxford, U K; 77-86.

Rubio, O.D. (1994). Efecto de la adición de proteasas en el proceso madurativo de los embutidos crudos curados. Dissertação para obtenção do grau de Doutor em Veterinária. Universidade Complutense de Madrid.

Ruiz, J. (2007). Ingredients. In Toldrá F. (Eds), *Handbook of fermented meat and poultry*. Blackwell Publishing Professional. Oxford, UK; 59-76.

Rust, R. E. (2007). U.S Products. In Toldrá F. (Eds), *Handbook of fermented meat and poultry*. Blackwell Publishing Professional. Oxford, UK; 303-306.

Salavessa, J. (2009). Caracterização e melhoramento da tecnologia de fabrico dos Maranhos: Salsicharia tradicional da Zona do Pinhal. Dissertação de Doutoramento em Ciencia e Tecnologia Animal. Lisboa: FMV- UTL.

Sanz, Y., Vila, R., Toldrá, F., Nieto, P., Flores, J. (1997). Effect of nitrate and nitrite curing salts on microbial changes and sensory quality of rapid ripened sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 37, 225-229.

Scheifer, K.H. (1986). Gram positive Cocci. Section 2. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Ed. Sneath P.H.A.. Vol. 2 (pp 999-1035) Williams & Wilkins. USA.

Schiffner, E., Oppel, K., Lörtzing, D. (1996). Embutido cruído: In: Elaboración casera de carne y embutidos. Acribia (eds.), Zaragoza, Espanha. 83-128.

Schleifer, K.H. & Fischer U. (1982). Description of a new species of the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus carnosus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 153-156.

Silla-Santos, M.H. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 29, 213-231.

Simeoni, D., Rizzotti, L., Cocconcelli, P., Gazzola, S., Dellaglio, F. & Torriani, S. (2008). Antibiotic resistance genes and identification of staphylococci collected from the production chain of swine meat commodities. *Food Microbiology*, 25, 196-201.

Simonová, M., Strompfová, V., Marciňáková, M., Lauková, A., Vesterlund, S., Latorre-Moratalla, M. L., Bover-Cid, S. & Vidal-Carou, M. C. (2006). Characterization of *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* isolated from Slovak meat products. *Meat Science*, 73, 559-564.

Sorum H. & Sunde M. (2001). Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. *Veterinary Research*, 32, 228-241.

Suzzi, G. & Gardini, F. (2003). Biogenic amines in dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 41-54.

Seager, M. S., Banks, J. G., Blackburn, C. W., Board, R. G. 1986. A taxonomic study of *Staphylococcus* spp. isolated from fermented sausages. *Journal of Food Science* 51, 295-97.

Stahnke, L. H., Holck, A., Jensen, A., Nilsen, A., Zanardi, E. (2000). Flavour compounds related to maturity of dried fermented sausage. Proceedings of 46th *International Congress of Meat Science and Technology*. Buenos Aires, Argentina 236-237.

Talon, R., Barriere, C., Centeno, J. A. (2000). Role of staphylococci in the oxidation of free fatty acids. *International Congress of Meat Science and Technology*, 46th 290-291.

Talon, R., Leroy, S. (2006). Latest Developments in meat bacterial starters. In Nollet, L.M.L., Toldrá, F., *Advanced Technologies for meat processing*, (Taylor & Francis Group. New York, USA; 401-413.

Talon, R., Leroy, S., Lebert, I. (2007). Microbial ecosystems of traditional fermented meat products: The importance of indigenous starters. *Meat Science*, 77, 55-62.

Talon, R., Leroy, S., Lebert, I., Giammarinaro, P., Chacornac, J-P., Latorre-Moratalla, M., Vidal - Carou, C., Zanardi, E., Conter, M., Leecque, A. (2008). Safety improvement and preservation of typical sensory qualities of traditional dry fermented sausages using autochthonous starter culture. *International journal of food microbiology*, 126, 227-234.

Talon, R., Leroy, S., (2011). Diversity and safety hazards of bacteria involved in meat fermentations. *Meat Science*, 89, 303-309.

Tanasupawat, S., Hashimoto, Y., Ezaki, T., Kozaki, M. & Komagata, K. (1991). Identification of *Staphylococcus carnosus* strains from fermented fish and soy sauce mash. *Journal of Genetic Applied Microbiology*, 37, 479-494.

Todar, K. (s.d.). Bacterial Resistance to Antibiotics. em *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. Visualizado Agosto 27, 2013, no http://textbookofbacteriology.net/resantimicrobial_3.html

Toldrá, F. (2006). Meat Fermentation. In Hui, Y.H, *Handbook of Food Science, Technology and engineering*. Taylor & Francis. Nova York, USA; vol.4, pp- 1-9.

- Toldrá, F. (2007). Biochemistry of meat and fat. In Toldrá F. (Eds), *Handbook of fermented meat and poultry*. Blackwell Publishing Professional. Oxford, UK; 51-58.
- Toldrá, F., Reig, M. (2007). Chemical origin Toxic compounds. In Toldrá F. (Eds), *Handbook of fermented meat and poultry*. Ed. Blackwell Publishing Professional. Oxford, UK; 469-480
- Towsend, W.E.& Olson, D.G. (1994). Las carnes curadas y su procesado: Ciencia de la carne y de los productos cárnicos, J. F. Price and B. S. Schweigert (eds.), Acribia. Zaragoza, Espanha; 393-414.
- Wu, Y., Chi, S., (2007). Casings. In Toldrá, F. (Eds), *Handbook of fermented meat and poultry*. Ed. Blackwell Publishing Professional. Oxford, UK; 101-110.
- Verluyten, J., Leroy, F., Lus de Vuyst. (2004). Effects of different spices used in production of fermented sausages on growth of and Curvacin A Production by *Lactobacillus curvatus* LTH 1174, *Applied and Environmental Microbiology*. 70, pp. 4807- 4813.
- Vidal-Carou, M. C., Venciana-Noguéz, T., Latorre-Moratalla, M. L. & Bover-Cid, S.(2007). Biogenic Amines: risks and control. In: F. Todrá (ed.), *Handbook of fermented meat and poultry*. Ames, IA: *Blackwell Publishing Professional*. 455-468.
- Vignolo, G., Fontana, C., Fadda, S. (2010). Semidry and dry fermented sausages. In Toldrá, F, *Handbook of meat processing*, (pp.379-398). Iowa, E.U.A. WilleyBlackwell.
- Zanardi, E., Ghidini, S., Battaglia, A., Chizzolini, R. (2004). Lipolysis and lipid oxidation in fermented sausages depending on diferente processing conditions and diferente antioxidants. *Meat Science*. 66, 415-423.
- Zell, C., Resch, M., Rosenstein, R., Albrecht, T., Hertel, C., Gotz, F. (2008). Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures. *International journal of food microbiology*, 127, 246-251.